



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS
Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia

QUÍMICA BIOLÓGICA
GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS
AÑO: 2017

INGENIERÍA EN ALIMENTOS
LICENCIATURA EN CIENCIA y
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

Profesores: Dra. Ana Cecilia Anzulovich, Dra. Fanny Zirulnik
Responsables de T.P.: Dra. Ethelina Cargnelutti, Dra. Mariela Coria

La presente Guía de Trabajos Prácticos pertenece al curso de Química Biológica, del tercer año de la carrera de Ingeniería en Alimentos y del segundo año de la carrera de Licenciatura en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Este curso obligatorio corresponde al ciclo básico, posee un crédito horario de 6 hs semanales (2 hs de clases teóricas, 2 hs de Trabajos Prácticos de Aula y 2 hs de Trabajos Prácticos de Laboratorio), y un total de 90 hs, que se dictan en el segundo cuatrimestre del año.

De acuerdo a lo estipulado en el Plan 38/11 de la carrera de Ingeniería en Alimentos, para el cursado de Química Biológica, es necesario tener aprobado el curso de Biología General y regularizados los cursos de Fisicoquímica Aplicada y Química Analítica I. Para rendir el curso de Química Biológica se requieren aprobados los cursos de Fisicoquímica Aplicada, Química Analítica I y Biología General.

De acuerdo a lo estipulado en el Plan 09/12 de la carrera de Licenciatura en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, para el cursado de Química Biológica, es necesario tener aprobados los cursos de Biología General y Química General e Inorgánica, y regularizado el curso de Química Orgánica. Para rendir el curso de Química Biológica se requieren aprobados los cursos de Química Orgánica, Química General e Inorgánica y Biología General.

Esta Guía de Trabajos Prácticos consta de una primera parte constituida por los Trabajos Prácticos de Aula, y una segunda parte que incluye los Trabajos Prácticos de Laboratorio.

Durante el desarrollo del curso el alumno adquirirá conocimientos sobre:

1.-Enzimas: el alumno aprenderá sobre las propiedades generales, las características cinéticas y los mecanismos de regulación de las enzimas.

2.- Los procesos de obtención de energía metabólica y su utilización en los distintos procesos biológicos.

3.-El metabolismo celular. Se estudiarán las vías metabólicas de degradación y de biosíntesis, las reacciones enzimáticas fundamentales y sus mecanismos de regulación.

Además la realización de los Trabajos Prácticos de Laboratorio permitirá a los alumnos, desarrollar destrezas en el manejo de instrumental, conocer distintas metodologías y aplicar los conocimientos teóricos adquiridos. Los Trabajos Prácticos de Aula facilitarán a los alumnos la fijación y aplicación de los conceptos teóricos de los distintos temas.

Los docentes encargados del dictado de este curso son: Dra. Ana Cecilia Anzulovich y Dra. Fanny Zirulnik (Profesores Responsables), Dra. Ethelina Cargnelutti y Dra. Mariela Coria (Jefes de Trabajos Prácticos).

ÍNDICE

REGLAMENTO DE TRABAJOS PRÁCTICOS - APROBACIÓN DE PARCIALES.....	4
CRONOGRAMA.....	6
PRIMERA PARTE: TRABAJOS PRÁCTICOS DE AULA	
TRABAJO PRÁCTICO N° 1: ENZIMAS.	10
TRABAJO PRÁCTICO N° 2: TRANSPORTE ELECTRÓNICO-FOSFORILACIÓN OXIDATIVA	23
TRABAJO PRÁCTICO N° 3: METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS	33
TRABAJO PRÁCTICO N° 4: CICLO DE KREBS - VÍA DE LAS PENTOSAS – METABOLISMO DE POLISACÁRIDOS.....	43
TRABAJO PRÁCTICO N° 5: BIOSÍNTESIS Y DEGRADACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS– METABOLISMO DE COLESTEROL – CICLO DEL GLIOXILATO	59
TRABAJO PRÁCTICO N° 6: DEGRADACIÓN DE AMINOÁCIDOS	77
TRABAJO PRÁCTICO N° 7: METABOLISMO DE NUCLEÓTIDOS	87
SEGUNDA PARTE: TRABAJOS PRÁCTICOS DE LABORATORIO	
NORMAS DE SEGURIDAD EN EL LABORATORIO	102
TRABAJO PRÁCTICO N° 1: CURVA DE CALIBRACIÓN	104
T.P. N° 2: ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.	109
T.P. N° 3: TRANSPORTE ELECTRÓNICO MITOCONDRIAL. FOSFORILACIÓN OXIDATIVA.	118
T.P. N° 4: METABOLISMO DE LOS HIDRATOS DE CARBONO: VÍA GLICOLÍTICA. DEMOSTRACIÓN DE LA FERMENTACIÓN ANAERÓBICA EN LEVADURAS	121
T.P. N° 5: DETERMINACIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO.....	127
T.P. N° 6: METABOLISMO DE PROTEÍNAS. ACTIVIDAD DE INHIBIDORES DE PROTEASAS PRESENTES EN SOJA.....	132

REGLAMENTO DE TRABAJOS PRÁCTICOS - APROBACIÓN DE PARCIALES

ALUMNOS REGULARES

1. Los alumnos conocerán, al comenzar el cuatrimestre, las fechas y los temas de los trabajos prácticos de aula y de laboratorio, como así también las fechas de las Evaluaciones Parciales. Todo lo mencionado será informado en el avisador de la asignatura.

2. La fundamentación teórica de los trabajos prácticos se encontrará desarrollada en las clases teóricas así como en la guía de trabajos prácticos.

3. La bibliografía de cada uno de los temas a desarrollar estará a disposición de los alumnos en el Área de Química Biológica y se les dará a conocer la que se encuentra para consulta en Biblioteca.

4. Los conocimientos del alumno sobre la fundamentación teórica de los Trabajos Prácticos, serán evaluados antes, durante, o al final del desarrollo de los mismos.

5. Cada alumno llevará un cuaderno o carpeta en el que consignará los resultados y observaciones, a la manera de informe de los Trabajos Prácticos realizados. Al final de cada jornada el Jefe de Trabajos Prácticos podrá revisar y constatar los resultados obtenidos.

6. Para la aprobación de los Trabajos Prácticos el alumno deberá obtener resultados adecuados, responder satisfactoriamente las preguntas y cuestionarios de trabajos prácticos, y para ser considerado alumno regular en el curso deberá aprobar las Evaluaciones Parciales programadas y haber asistido al menos al 60% de las clases teóricas.

7. De acuerdo a la reglamentación vigente (Ord. N° 13/03 y su modificatoria Ord. N° 32/14) los alumnos deberán aprobar el cien por ciento (100%) de los Trabajos Prácticos y de las Evaluaciones Parciales sobre los mismos.

8. Por las mismas reglamentaciones, los alumnos tendrán dos (2) oportunidades de recuperación de los Trabajos Prácticos de laboratorio y aula, debiendo aprobar en primera instancia el 75% (o su fracción menor) de los trabajos prácticos completando la aprobación del noventa por ciento (90%) en la primera recuperación. En la segunda recuperación deberá totalizar la aprobación del cien por ciento (100%) de los Trabajos Prácticos.

9. Para poder rendir cada evaluación parcial, los alumnos deberán tener aprobado el ciento por ciento (100%) de los trabajos prácticos cuyos contenidos se evalúan en dicha evaluación. Estas evaluaciones podrán ser escritas u orales y se aprobarán con el 65% del puntaje total.

10. Teniendo en cuenta la Ord. N° 32/14, para ser considerado como alumno regular se deberá aprobar el 100% de las Evaluaciones Parciales. Cada Parcial tendrá dos (2) recuperaciones. La primera recuperación se llevará a cabo en no menos de 48 horas de

publicado el resultado del Parcial. La segunda recuperación se realizará al final del cuatrimestre. Ambas recuperaciones se aprobarán con el 75% del puntaje total.

ALUMNOS CON PROMOCIÓN SIN EXÁMEN FINAL

Este Curso de Química Biológica considera la posibilidad de aprobación por **Promoción sin examen final**. Para acceder a dicha Promoción los alumnos deberán:

a- En el momento de inscribirse al curso, cumplir con las exigencias de correlatividades establecidas en el plan de estudio para rendir el examen final de esta asignatura.

b- Cumplir con la asistencia al 80% de las clases teóricas.

c- Aprobar los trabajos prácticos de laboratorio y aula con igual exigencia que los alumnos regulares.

d- Aprobar cada evaluación parcial con el 70% de los temas de la condición regular más el 70% de los contenidos propios de la condición promocional.

e- Aprobar una evaluación adicional, de modalidad individual, escrita u oral, sobre los temas restantes para completar el programa de la asignatura

f- Los alumnos que opten por la Promoción sin examen final tendrán solo dos (2) recuperaciones para todas las evaluaciones Parciales. Estas recuperaciones se aprobarán con el 75% del puntaje total.

g- Pérdida de la promoción: en el caso de no satisfacerse algunas de las condiciones establecidas en este reglamento, el alumno será considerado regular si cumple con las respectivas condiciones de regularidad.

h- La nota final de la materia será igual al promedio de las calificaciones obtenidas en todas las evaluaciones.

CRONOGRAMA DE TEORÍAS y TRABAJOS PRÁCTICOS**CLASES TEÓRICAS:****Martes 17:00-18:30 h** (aula Magna), **Jueves 11:00-12:30 h** (Aula 37)**TRABAJOS PRÁCTICOS DE AULA: Viernes 16:00-18:00 hs.** (Aula 39)**TRABAJOS PRÁCTICOS DE LABORATORIO: Lunes 10:00-13:00 hs** (Lab. de Qca. Biológica).**AGOSTO**

MARTES 08	INSCRIPCIONES PARA CURSAR
JUEVES 10	ENZIMAS
LUNES 14	TRABAJO PRÁCTICO DE LAB. N° 1: Curva de calibración.
MARTES 15	ENZIMAS (continuación)
JUEVES 17	ENZIMAS DE OXIDOREDUCCIÓN. CADENA RESPIRATORIA
VIERNES 18	TRABAJO PRÁCTICO DE AULA N° 1: Enzimas
LUNES 21	FERIADO
MARTES 22	CADENA RESPIRATORIA (continuación).
JUEVES 24	ALIMENTOS. DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN DE HIDRATOS DE CARBONO.
VIERNES 25	FERIADO
LUNES 28	TRABAJO PRÁCTICO DE LAB. N° 2: Enzimas.
MARTES 29	METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO: VÍA GLICOLÍTICA. SISTEMAS DE LANZADERA. DESTINO DEL PIRUVATO.
JUEVES 31	METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO: CICLO DE KREBS.

SETIEMBRE

VIERNES 1	TRABAJO PRÁCTICO DE AULA N° 2: Cadena respiratoria.
LUNES 4	TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 3: Transporte electrónico.
MARTES 5	METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO: CICLO DE KREBS (continuación). VÍA DE LAS PENTOSAS. GLUCONEOGÉNESIS.
JUEVES 7	METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO: METABOLISMO DE GLUCÓGENO Y ALMIDON. CONSULTA PRIMER PARCIAL.

VIERNES 8	PRIMER PARCIAL: ENZIMAS- CADENA RESPIRATORIA
LUNES 11	FERIADO
MARTES 12	METABOLISMO DE LÍPIDOS: DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN DE LÍPIDOS.
JUEVES 14	METABOLISMO DE LÍPIDOS: LIPOPROTEÍNAS
VIERNES 15	TRABAJO PRÁCTICO DE AULA N° 3: Metabolismo de hidratos de carbono: vía glicolítica. Fermentaciones.
LUNES 18	TRABAJO PRÁCTICO DE AULA N° 4: Efecto Pasteur.
MARTES 19	METABOLISMO DE LÍPIDOS: DEGRADACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS.
JUEVES 21	FERIADO
VIERNES 22	TRABAJO PRÁCTICO DE AULA N° 4: Ciclo de Krebs. Vía de las pentosas fosfato. Metabolismo de glucógeno.
LUNES 25	TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 5: Ácido cítrico.
MARTES 26	METABOLISMO DE LÍPIDOS: BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS. CICLO DEL GLIOXILATO.
JUEVES 28	METABOLISMO DE LÍPIDOS: SÍNTESIS DE FOSFOLÍPIDOS, TRIGLICÉRIDOS Y COLESTEROL. CONSULTA 2° PARCIAL
VIERNES 29	SEGUNDO PARCIAL: METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO
<u>OCTUBRE</u>	
LUNES 2	TRABAJO PRÁCTICO DE AULA N° 5A: degradación de ácidos grasos. Ciclo del glioxilato.
MARTES 3	METABOLISMO DE LÍPIDOS: SÍNTESIS DE FOSFOLÍPIDOS, TRIGLICÉRIDOS Y COLESTEROL (continuación).
JUEVES 5	DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN DE PROTEÍNAS.
VIERNES 6	TRABAJO PRÁCTICO DE AULA N° 5B: Biosíntesis de ácidos grasos. Metabolismo de colesterol.
LUNES 9	RECUPERACIÓN PARCIAL
MARTES 10	METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS
JUEVES 12	METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS (continuación). CONSULTA 3° PARCIAL.
VIERNES 13	TERCER PARCIAL.
LUNES 16	FERIADO
MARTES 17	METABOLISMO DE NUCLEÓTIDOS.

JUEVES 19	ADN y ARN. REPLICACIÓN Y TRANSCRIPCIÓN.
VIERNES 20	TRABAJO PRÁCTICO DE AULA N° 6: Metabolismo de aminoácidos.
LUNES 23	TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 6: Actividad de proteasas.
MARTES 24	BIOSÍNTESIS DE PROTEÍNAS. REGULACIÓN
JUEVES 26	ALIMENTOS TRANSGÉNICOS.
VIERNES 27	TRABAJO PRÁCTICO DE AULA N° 7: Metabolismo de nucleótidos.
LUNES 30	RECUPERACIÓN PARCIAL
MARTES 31	INTERRELACIONES METABÓLICAS. CONSULTA CUARTO PARCIAL

NOVIEMBRE




JUEVES 2	CUARTO PARCIAL. METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS Y NUCLEÓTIDOS.
LUNES 6	RECUPERACIÓN PARCIAL
MARTES 7	RECUPERACIÓN PARCIAL
JUEVES 9	RECUPERACIÓN PARCIAL
VIERNES 10	RECUPERACIÓN PARCIAL
LUNES 13	RECUPERACIÓN PARCIAL
MARTES 14	RECUPERACIÓN PARCIAL
VIERNES 17	PARCIAL PROMOCIONALES

TRABAJOS PRÁCTICOS DE AULA

TRABAJO PRÁCTICO N°1

ENZIMAS

OBJETIVOS

-  Conocer las distintas formas de determinar la actividad de una enzima y los factores que modifican dicha actividad.
-  Conocer la naturaleza y función de las enzimas reguladoras.
-  Reconocer la aplicación y los usos de enzimas en la industria alimentaria.

INTRODUCCION TEÓRICA

Las enzimas son catalizadores biológicos muy utilizados en la industria alimentaria por ser más eficaces que los catalizadores no enzimáticos. Las enzimas se encuentran normalmente en los productos naturales utilizados en la alimentación.

El tratamiento tecnológico de los alimentos exige cuidados dirigidos a conservar, inhibir o estimular la actividad de las enzimas presentes en ellos, debiendo tenerse en cuenta que entre otras cosas:

a) El mantenimiento de las actividades enzimáticas en los vegetales luego de la recolección en los animales después del sacrificio, tiene profundos efectos sobre la calidad de los alimentos.

b) Las enzimas pueden ser bastante activas en amplios rangos de temperatura, incluso a temperatura de congelación, por ello pueden catalizar reacciones de degradación aún en alimentos refrigerados o congelados.

El experto en alimentos debe esforzarse en lograr un conocimiento suficiente de la enzimología alimentaria en relación a la cinética de las reacciones, especificidad, compartimentalización, factores que afectan la actividad enzimática (pH, temperatura, fuerza iónica, entre otros), acción de inhibidores, etc.

Las **enzimas** pueden catalizar reacciones en un determinado producto alimentario después de su elaboración una vez que ha alcanzado su madurez, por lo tanto es necesario controlar la actividad de las mismas de manera de estabilizar el producto. Esto es posible regulando los distintos factores que influyen sobre la actividad de las enzimas. Por ejemplo, la mayoría de las reacciones enzimáticas disminuyen su velocidad cuando un alimento es colocado en el refrigerador, también se puede disminuir la concentración de una determinada enzima ya sea por acción del calor, ingeniería genética, etc., disminuyendo de esta forma la actividad enzimática.

Entre los factores que modifican la actividad enzimática, y que deben ser tenidos en cuenta para determinar la actividad de enzima presente en una muestra, se encuentran:

- concentración de enzima
- concentración de sustrato
- temperatura
- pH
- fuerza iónica
- concentración de cofactores
- presencia de inhibidores.

Medida de la actividad enzimática

La actividad de una enzima puede determinarse midiendo la cantidad de producto formado o de sustrato consumido en un tiempo dado, en una mezcla que contenga todos los factores requeridos para la reacción.

A fin de que la determinación guarde relación con la cantidad de enzima presente, es necesario medir la velocidad inicial, es decir, aquella obtenida cuando todavía la cantidad de sustrato consumido es insignificante en relación con el sustrato total presente en la mezcla. Para medir la actividad de una preparación enzimática se utilizan distintas expresiones:

La cantidad de enzima se indica habitualmente en **Unidades Internacionales**.

Una **Unidad de** cualquier **enzima** es la cantidad que cataliza la transformación de un micromol ($1\mu\text{mol} = 10^{-6} \text{ mol}$) de sustrato por minuto bajo condiciones definidas de pH y temperatura.

$$\text{Unidad de Enzima} = \frac{\mu\text{mol de Sustrato Transformado}}{\text{min.}}$$

La **actividad específica** indica la pureza relativa de una preparación enzimática y relaciona la actividad enzimática no ya al volumen de la muestra, sino al total de proteínas existentes en la misma.

$$\text{Actividad Específica} = \frac{\mu\text{mol de S. transformado/min. (Unidad de enzima)}}{\text{mg de proteínas}}$$

Un aumento de la actividad específica indicará que se han ido eliminando proteínas que no tienen la acción catalítica perseguida. La actividad específica llega a ser máxima y constante cuando la enzima se encuentra al estado puro.

Cuando se tiene la enzima al estado puro y se conoce su peso molecular, se puede calcular su **actividad molar, índice de cambio ó número de recambio** que corresponde al número de moléculas (o moles) de sustrato convertidos en producto por unidad de tiempo (minuto) por una molécula (o mol) de enzima trabajando en condiciones de saturación de sustrato, lo que corresponde a la velocidad máxima en presencia de un mol de enzima.

$$\text{Índice de Cambio} = \frac{\text{Moles de sustrato transformado/min.}}{\text{mol de enzima}}$$

Si se mide la actividad de una enzima a diferentes concentraciones de sustrato, inicialmente cuando las concentraciones de sustrato son bajas, la actividad aumenta rápidamente con los incrementos en la concentración de sustrato, pero a niveles más elevados de sustrato el incremento de la velocidad enzimática se va haciendo más lento, tendiendo a alcanzar un valor de actividad máximo, el cual no aumenta por más que se siga incrementando la concentración de sustrato. Este comportamiento queda expresado en la siguiente gráfica presentada en la figura 1.1. Michaelis y Menten establecieron una relación entre la velocidad de reacción y la concentración de sustrato mediante una constante llamada K_m (constante de Michaelis Menten), y dedujeron que la hipérbola que corresponde a la curva de saturación de una enzima por su sustrato puede expresarse con la siguiente ecuación:

$$v = \frac{V_{\text{máx.}} [S]}{K_m + [S]}$$

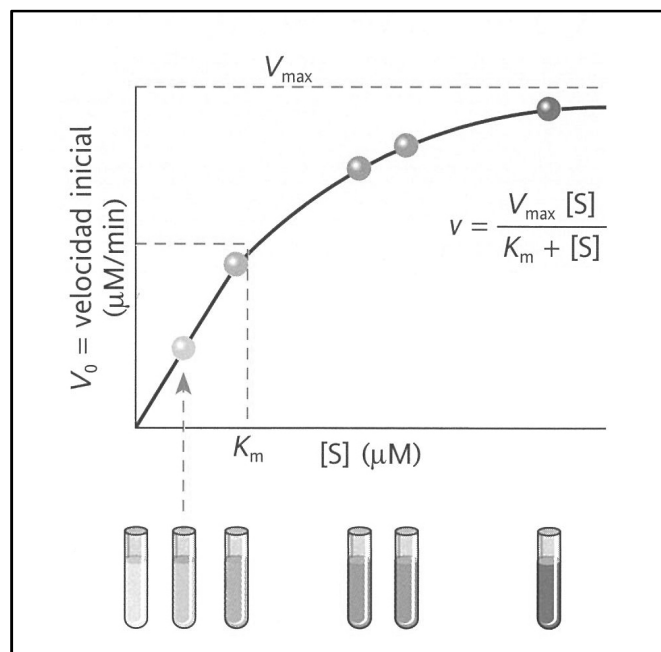


Fig 1.1: Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial de una reacción catalizada por una enzima. V₀: velocidad inicial. K_m: constante de Michaelis-Menten. V_{máx}: velocidad máxima. [S]: concentración de sustrato. Feduchi, Blasco, Romero, Yáñez. “Bioquímica. Conceptos esenciales”, 2015.

Se puede definir K_m como la concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción alcanza un valor igual a la mitad de la velocidad máxima. En condiciones definidas de medio de reacción, pH, temperatura, etc., K_m tiene un valor fijo para cada sustrato de una misma enzima, se expresa en unidades de concentración, y sirve para caracterizarla.

La ecuación de Michaelis-Menten puede ser transformada algebraicamente en ecuaciones equivalentes utilizables para la determinación práctica del valor de K_m. Un ejemplo de ello es la ecuación de Lineweaver-Burk, que resulta de realizar la inversa de la ecuación de Michaelis-Menten, y corresponde a la ecuación de una recta que no pasa por el origen. La representación gráfica de esta ecuación se encuentra en la figura 1.2.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

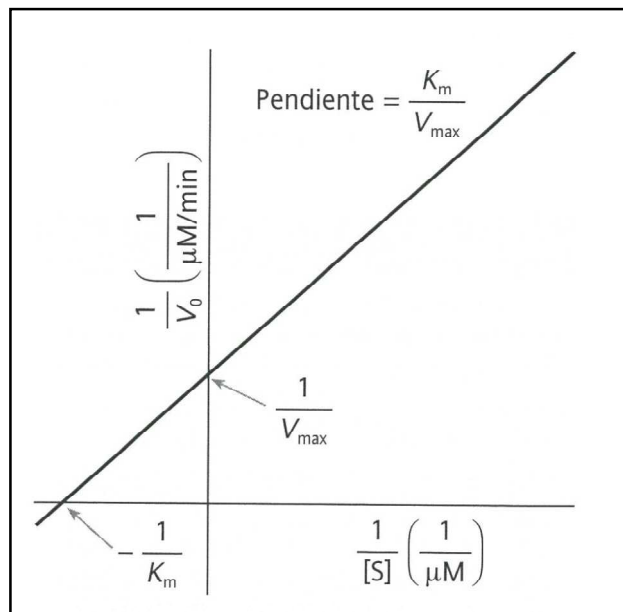


Fig. 1.2. Representación gráfica de la ecuación de Lineweaver-Burk. [S]: concentración de sustrato. v_0 : velocidad enzimática. K_m : constante de Michaelis-Menten. V_{\max} : velocidad máxima. Feduchi, Blasco, Romero, Yáñez. “Bioquímica. Conceptos esenciales”, 2015.

Enzimas reguladoras

La actividad de las enzimas en las células puede ser regulada por varios mecanismos.

En casi todas las vías metabólicas existen una ó más enzimas que actúan como reguladoras. Estas enzimas pueden aumentar o disminuir su actividad de acuerdo a señales específicas. Dentro de este grupo de enzimas se pueden distinguir las alostéricas y las reguladas por unión covalente.

Las **enzimas alostéricas** no poseen una cinética Michaeliana y la gráfica de actividad vs concentración de sustrato ($[S]$) da una curva sigmoidea (figura 1.3). En la estructura molecular de las enzimas alostéricas además del sitio catalítico existen otros sitios denominados reguladores, a los cuales se unen específicamente moléculas que ejercen acción activadora o inhibidora sobre la actividad enzimática. Estos agentes se llaman moduladores, modificadores o efectores alostéricos y pueden actuar de modo positivo o negativo.

Las enzimas alostéricas están constituidas por varias subunidades polipeptídicas entre las cuales existe algún tipo de comunicación, que hace que cuando un modulador positivo o negativo se une a ellas, ocurra un cambio de conformación que se transmite a las otras subunidades, de tal forma que favorece o impide la unión del sustrato al sitio activo, según se trate de un modulador positivo o negativo, respectivamente (figura 1.3).

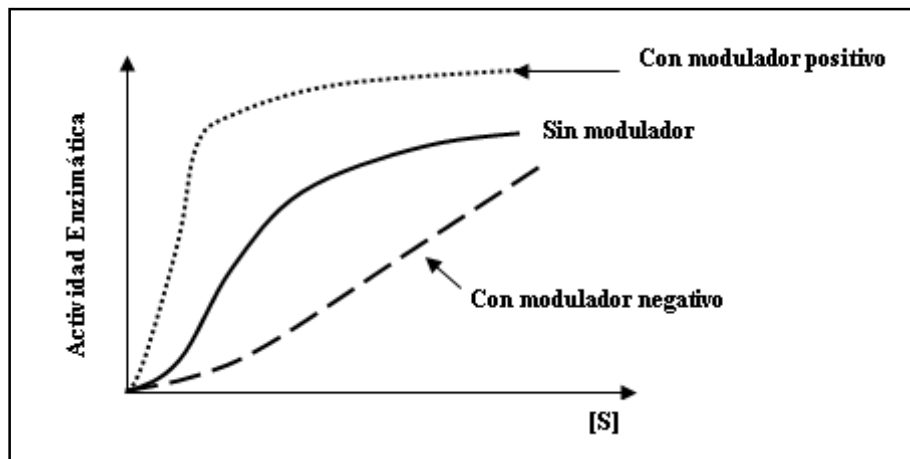


Fig. 1.3. Representación gráfica del comportamiento cinético de una enzima alostérica, en presencia y ausencia de moduladores alostéricos.

La actividad de algunas enzimas también es regulada por la unión covalente o remoción de grupos químicos (fosfatos, AMP, etc.) a la estructura proteica. Las enzimas que responden a este tipo de regulación son denominadas **“enzimas reguladas por modificación covalente”**. Con mayor frecuencia el grupo añadido o removido es un grupo fosfato, el cual se une o remueve sobre residuos de los aminoácidos serina, treonina o tirosina, específicos de la proteína enzimática. Las reacciones de fosforilación son catalizadas por una familia de enzimas llamadas *quinasas* de proteínas, las cuales utilizan como dador del grupo fosfato al ATP. A su vez, los grupos fosfatos se separan de las enzimas fosforiladas por la acción de enzimas llamadas *fosfatasas* de proteínas. Las reacciones de fosforilación y desfosforilación se representan en la figura 1.4.

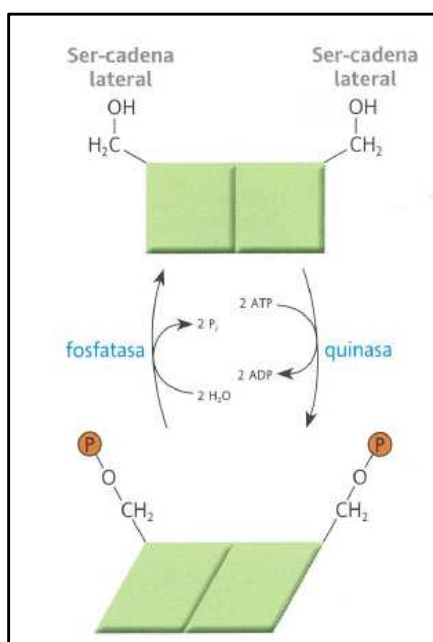


Fig. 1.4. Esquema de regulación enzimática por modificación covalente. Feduchi, Blasco, Romero, Yáñez, "Bioquímica. Conceptos esenciales", 2015.

Enzimas y alimentos

Los efectos de las enzimas sobre los diferentes componentes de los alimentos son múltiples, y muchos de ellos son de tipo degradativo enmascarando los efectos beneficiosos desarrollados por la actividad de otras enzimas. La industria de alimentos en sus etapas iniciales dedicó gran parte de sus esfuerzos al conocimiento de las enzimas endógenas de los diversos alimentos y a los factores que podrían utilizarse para controlar su actividad, con lo cual se buscaba disminuir los efectos de degradación y aumentar la vida útil de los productos perecederos.

La mayoría de las enzimas endógenas de los alimentos pertenecen al grupo de las oxidorreductasas y al de las hidrolasas y su actividad puede producir cambios deseables (por ejemplo maduración de las frutas, cambios posmortem de la carne, desarrollo de sabores), efectos degradativos (enranciamiento de los lípidos debido a la acción de las lipasas, degradación de los vegetales debido a peroxidasas) o incluso disminución en el valor nutricional del alimento por destrucción de nutrientes específicos (por ejemplo pérdida de ácido ascórbico por la acción de la ácido ascórbico oxidasa).

Enzimas indicadoras de procesos térmicos

Los procesos térmicos a los cuales se someten algunos alimentos fueron diseñados para disminuir los riesgos al consumidor o para mejorar las características organolépticas del alimento.

Ciertos productos ampliamente utilizados, como la leche, pueden ser portadores de microorganismos patógenos causales de diversas enfermedades tales como tuberculosis, salmonelosis, brucelosis, etc, sin embargo estos microorganismos pueden ser destruidos mediante la pasteurización. El proceso de pasteurización consiste en destruir mediante el empleo apropiado del calor, la totalidad de la flora patógena y la casi totalidad de la flora banal que pudiese estar presente en el alimento, procurando alterar lo menos posible su estructura física, su equilibrio químico y contenido en vitaminas. Existen distintos procesos de pasteurización siendo el más utilizado la pasteurización a altas temperaturas durante un breve período (HTST, High Temperature/Short Time) en la cual el alimento se somete a 72 °C durante 15 segundos. Durante la pasteurización muchas enzimas endógenas son destruidas, y aquellas más termorresistentes, que requieren temperaturas y tiempos precisos para ser inactivadas, pueden ser utilizadas como marcadoras de la eficiencia del tratamiento térmico.

La relación que existe entre la enzima marcadora y los microorganismos patógenos presentes en el alimento es nula. Los microorganismos patógenos son destruidos a determinadas temperaturas y al mismo tiempo, a esas temperaturas se modifica la actividad de las enzimas marcadoras.

A diferencia de lo que ocurre en la pasteurización donde la inactivación enzimática aparece en forma secundaria durante la destrucción de los microorganismos, el escaldado es un proceso térmico destinado a inactivar enzimas como lipasas, fenolasas, lipoxigenasas, clorofilasas, peroxidasa y ácido ascórbico oxidasa, que son las responsables del deterioro de los vegetales durante el almacenamiento. El escaldado consiste en someter a los tejidos durante unos pocos minutos a 100°C con agua caliente o vapor, seguido de un enfriamiento rápido. Se realiza previo a la congelación, secado o enlatado de los vegetales con el fin de inactivar el sistema enzimático, por lo tanto la eficiencia del proceso se evalúa analizando la enzima más termorresistente.

PROBLEMAS A RESOLVER

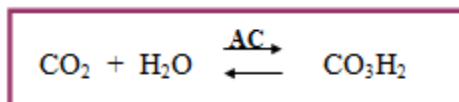
En el siguiente cuadro se muestra el progreso de una purificación enzimática, típica para una enzima hepática. Con los datos de purificación dados, calcular:

- Unidades totales
- Actividad específica
- Porcentaje de recuperación global

Interprete los resultados obtenidos.

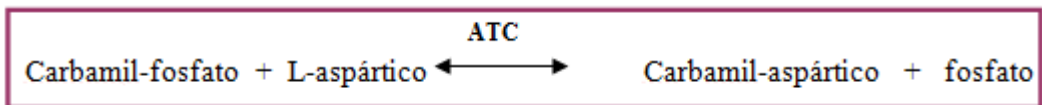
Fracción de la enzima	Volumen (ml)	U/ml	Unidades totales	Proteínas mg/ml	Actividad Específica	Porcentaje de Recuperación
Homogenato crudo de hígado	200	100		2,5		
Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 45%	80	200		1,25		
DEAE-celulosa	20	500		1,0		
Electroforesis	5	1500		1,0		
Cristalización	3	2000		0,3		

2) La anhidrasa carbónica (AC) de los glóbulos rojos ($\text{PM}=30.000$) se halla entre la enzimas más activas conocidas. Cataliza la hidratación reversible del anhídrido carbónico, importante en el transporte del CO_2 desde los tejidos a los pulmones:



Si $10 \mu\text{g}$ de la enzima pura catalizan la hidratación de $0,30 \text{ g.}$ de CO_2 en 1 minuto a 37°C en las condiciones óptimas, calcúlese el n° de recambio de la anhidrasa carbónica.

3) La enzima aspartato transcarbamilasa (ATC) cataliza la primera reacción propia de la biosíntesis de pirimidinas:

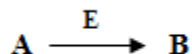


En un estudio cinético realizado para evaluar la actividad de ATC aislada de *E.coli* utilizando aspartico como sustrato, en presencia de CTP 0,5 M y en ausencia del mismo, se obtuvieron los siguientes datos:

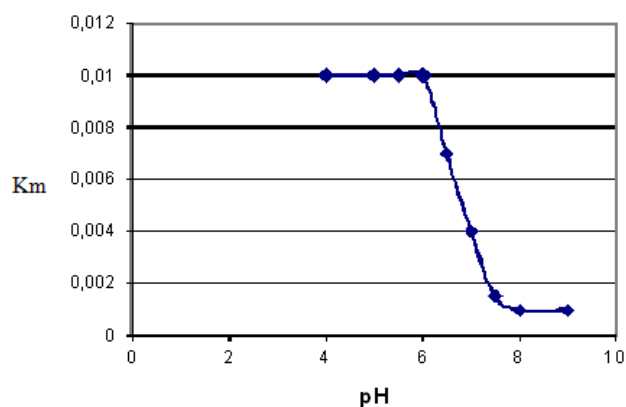
Aspartico (mmolar)	v (unidades arbitrarias)	
	Ausencia de CTP	CTP 0,5 M
1	0,45	0,20
3	1,70	0,70
4	2,90	1,00
5	3,40	1,40
7	4,30	2,40
9	5,10	3,70
12	5,60	4,80
16	5,80	5,60
17	5,80	5,60

- A partir de los datos de la tabla, estime el valor de K_m sin utilizar ninguna representación gráfica.
- Calcule K_m utilizando la ecuación de Michaelis Menten. ¿Existe alguna discrepancia entre los valores de K_m obtenidos? Justificar.
- ¿Qué efecto ejerce el CTP sobre el sistema enzimático? Justifíquelo graficando.

4) En un experimento realizado se trabajó con 1 μg de una enzima E y con 0,01 M de sustrato A, ambos implicados en la siguiente reacción enzimática:



La velocidad máxima de la actividad enzimática fue de 100 $\mu\text{moles/min/}\mu\text{g}$ de enzima, no habiendo variación de la misma en el rango de pH 5 a 9. El valor de K_m fue sensible a los cambios de pH, lo cuál puede ser observado en la siguiente gráfica:



- Calcule la velocidad inicial de reacción a pH 6,0 y a pH 8,0
- ¿Cuál de los dos valores de pH sería más conveniente para trabajar con esta enzima?
¿Por qué?
- ¿Cuál sería la concentración de sustrato para que a pH 6,00 la velocidad inicial alcanzada sea igual a la obtenida trabajando a pH 8,00?

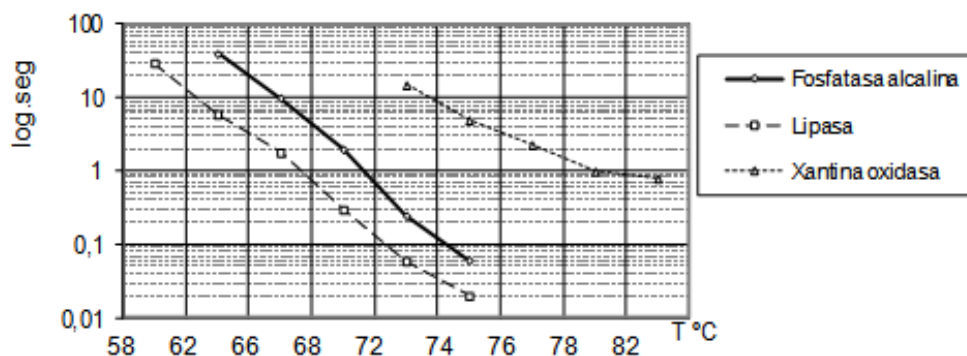
5) Una de las enzimas que regula su actividad por modificación covalente de su molécula es la glucógeno fosforilasa. Esta enzima actúa sobre el glucógeno liberando unidades de glucosa 1-fosfato. Cuando la glucógeno fosforilasa está fosforilada es activa (fosforilasa a) y cuando se desfosforila es inactiva (fosforilasa b). Considerando este concepto, indique qué le ocurriría a la actividad de la enzima en presencia de:

- fosforilasa quinasa y ATP
- fosforilasa fosfatasa
- Cuando se produce la hidrólisis del ATP en el músculo post mortem.

6) Durante el almacenamiento, conservación y/o procesado de los alimentos, las enzimas catalizan reacciones cuyos productos provocan flavor y aroma indeseables. Por ello, ciertos alimentos deben ser pre-tratados a fin de inactivar las enzimas responsables de dicha alteración. Teniendo en cuenta que existen enzimas termorresistentes que son utilizadas como indicadoras del adecuado tratamiento térmico, indique:

a) En base a los datos de la gráfica, si el proceso de pasteurización de la leche se puede realizar a 71,7 °C durante 15 segundos. ¿La actividad de qué enzima resultaría útil medir para determinar si la leche fue sometida a un adecuado proceso de pasteurización?

Relaciones de Tiempo y Temperatura para la inactivación de algunas enzimas de la leche



b) Durante el proceso de escaldado de frutas y verduras, una de las enzimas que se desea inactivar es la lipooxigenasa. Utilizando los datos de la tabla de actividad enzimática en guisantes, ¿qué enzima marcadora utilizaría en este caso y en qué condiciones de tiempo y temperatura trabajaría?

Actividad de enzimas en guisantes		
Enzima	Inactiva	Con Actividad Residual
<i>Peroxidasa</i>	5 min 90°C	3 min 70°C (50 % act.) 7 min 70°C (40% act.)
<i>Lipooxigenasa</i>	3 min 70°C	1 min 70°C (50% act.)
<i>Tiaminasa</i>	3 min 55 °C	3 min 45°C (40% act)

GUÍA DE ESTUDIO

Enzimas

- Cofactores enzimáticos.
- Unidad de Enzima, Actividad Específica e Índice de Cambio.
- Efecto del pH sobre la Actividad Enzimática.
- Efecto de la temperatura sobre las reacciones enzimáticas.

Enzimas alostéricas

- ¿Qué entiende por retroinhibición?
- ¿Qué propiedades tiene una enzima alostérica?
- ¿Cuál es el comportamiento de la enzima alostérica frente a concentraciones crecientes de sustrato?
- ¿Dónde se une el modulador o efector y cómo se modifica la actividad enzimática?

Enzimas reguladas por modificación covalente.

Aplicación y usos de enzimas en la industria alimentaria.

- Control de su actividad.

BIBLIOGRAFÍA

- Blanco, A., “Química Biológica”, Ed. El Ateneo, 8^{va}. ed., Bs. As. (2006).Cap.7.
- Feduchi, E., Blasco, I., Romero, C.S. y Yáñez, E. “Bioquímica. Conceptos esenciales”, Ed. Médica Panamericana, Bs. As. (2015). Cap. 8.
- Fennema, O., “Química de los Alimentos” Ed. Acribia S.A. España (2000), Cap. 6.
- Nelson D.L., Cox M.M. Lehninger. Principios de Bioquímica”, Ed. WH Freeman and Comapany, 5^{ta} ed., Inglaterra (2008).Cap.8.

TRABAJO PRÁCTICO N° 2

TRANSPORTE ELECTRÓNICO. FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

OBJETIVOS

- ✚ Conocer la localización y acción de las enzimas de la cadena respiratoria.
- ✚ Conocer y comprender el concepto de teoría quimiosmótica.
- ✚ Evaluar mediante ejemplos la acción de inhibidores y desacoplantes.

INTRODUCCION TEÓRICA

Una de las funciones principales de las mitocondrias es la de transformar la energía de óxido-reducción que se obtiene al degradar los alimentos, en energía química de enlaces anhidrido de ácido del ATP. La mayor parte de la síntesis de ATP se realiza en condiciones aeróbicas, durante la oxidación completa de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos. Los restos carbonados de estos compuestos ingresan al ciclo de Krebs, principalmente como acetil-CoA y también como otros intermediarios del ciclo, los cuales al ser oxidados hasta CO_2 y H_2O , producen a través de deshidrogenasas, equivalentes de reducción (hidrógenos y electrones) que son transportados a través de la cadena respiratoria (figura 2.2) de la membrana mitocondrial interna hasta el oxígeno, para formar agua. Este proceso se denomina **respiración celular**.

Cociente respiratorio

En la industria de alimentos tiene gran importancia el proceso de respiración celular en los vegetales. Luego de su recolección los vegetales continúan el proceso de respiración produciendo CO_2 y consumiendo oxígeno. Aquellos vegetales que tienen una gran actividad respiratoria, son más perecederos.

La respiración puede ser cuantificada según la cantidad de oxígeno que se consume o la cantidad de CO_2 que se genera. El cociente respiratorio (QR) es útil para detectar cambios en los procesos metabólicos, y se define como la relación existente entre el volumen de CO_2 liberado y el de O_2 consumido durante un tiempo determinado. Un incremento en el QR durante la respiración indica un aumento en las reacciones de descarboxilación o una disminución en las reacciones de carboxilación.

En determinadas condiciones de conservación (por ej. refrigeración, atmósferas controladas) es posible disminuir la tasa respiratoria y prolongar considerablemente la vida útil de un alimento.

Transporte electrónico - Fosforilación oxidativa

La energía producida por la transferencia de electrones a través de la cadena respiratoria (figura 2.2) es utilizada para la síntesis de ATP.

La **teoría quimiosmótica** (figura 2.1) sostiene que la energía redox del transporte electrónico se utiliza para expulsar H^+ desde la matriz hasta el espacio intermembrana, originando un **gradiente de protones** y creando una **diferencia de potencial eléctrico** entre ambas caras de la membrana. Como la membrana interna es impermeable a los protones, estos sólo la pueden atravesar mediante canales iónicos que permiten eludir la apolaridad de la membrana. Estas estructuras corresponden a la fracción proteica F_0 de los complejos $F_1 - F_0$ (ATP sintasa), partículas submitocondriales. Al ingresar los protones a través de la ATP sintetasa $F_1 - F_0$ proporcionan la energía necesaria para la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (P_i). El proceso se denomina **fosforilación oxidativa**.

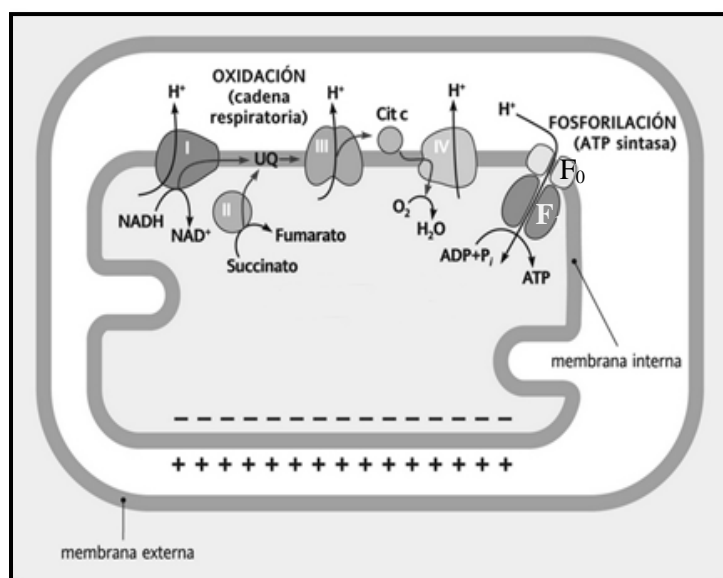


Fig 2.1. Esquema representativo de la hipótesis quimiosmótica. Modificado desde Feduchi, Blasco, Romero, Yañez. "Bioquímica. Conceptos esenciales", 2010.

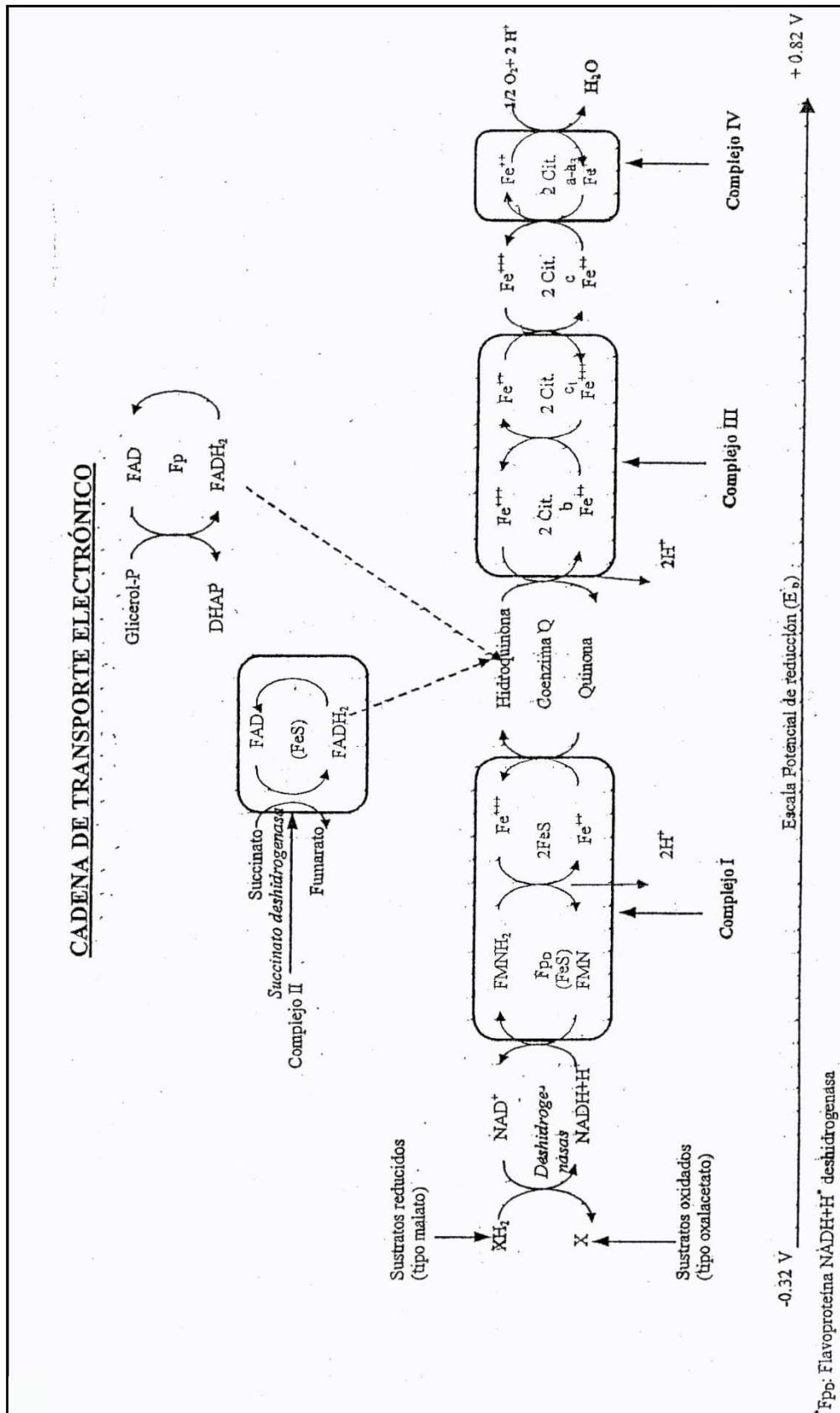


Fig 2.2. Esquema de los componentes de la cadena transportadora de electrones.

Inhibidores

Algunos compuestos actúan inhibiendo la transferencia de electrones y de este modo impiden la síntesis de ATP.

Compuesto	Comentario	Modo de Acción
Rotenona Amital Clorpromazina	Insecticida Barbitúrico: induce el sueño Sedante	Impiden la transferencia electrónica desde Fe-S a la CoQ
Antimicina A	Antibiótico	Bloquea la transferencia electrónica desde cit. b a cit. c ₁ (Complejo III)
Cianuro Monóxido de carbono Azida sódica	Veneno Gas tóxico Sustancia tóxica	Inhiben la citocromo oxidasa (CN ⁻ y azida reaccionan con la forma férrica del hemo y el CO, con la férrica).

Tabla 2.1 Inhibidores del transporte electrónico

Otros inhibidores bloquean directamente la fosforilación, pero al estar el sistema fuertemente acoplado, la oxidación también se bloquea.

Compuesto	Comentario	Modo de acción
Oligomicina	Antibiótico	Bloquea el flujo de protones a través de F ₀ .

Tabla 2.2 Bloqueantes de la Fosforilación Oxidativa

Desacoplantes

Son compuestos **liposolubles** que desconectan el acoplamiento que existe entre el transporte electrónico y la fosforilación oxidativa, impidiendo la síntesis de ATP, sin inhibir el flujo de electrones hacia el O₂. Se ubican en la membrana interna de la mitocondria y se comportan como ionóforos de protones, descargando el gradiente de protones generado por el transporte electrónico. Ejemplo: 2,4-dinitrofenol y dicumarol.

Gradiente de protones y transporte activo

Aunque en las mitocondria el papel principal del gradiente de protones es suministrar energía para la síntesis de ATP, la fuerza protón motriz también sirve para impulsar varios procesos de transporte a través de la membrana mitocondrial interna esenciales para la fosforilación. Entre ellos se encuentran los sistemas que transportan ADP y Pi hacia la matriz mitocondrial y ATP hacia el citosol celular.

La adenina nucleótido translocasa es la proteína encargada de unir ADP en el espacio intermembrana y transportarlo a la matriz, y transportar en sentido contrario el ATP. Cualquier sustancia que inhiba el transporte de ADP al interior y de ATP al exterior mitocondrial, impide la regeneración del ATP citosólico a partir de ADP, resultando altamente tóxico para las células.

Un segundo sistema de transporte esencial para la fosforilación oxidativa es la fosfato translocasa que promueve el cotransporte paralelo de H_2PO_4^- y un H^+ al interior de la matriz mitocondrial.

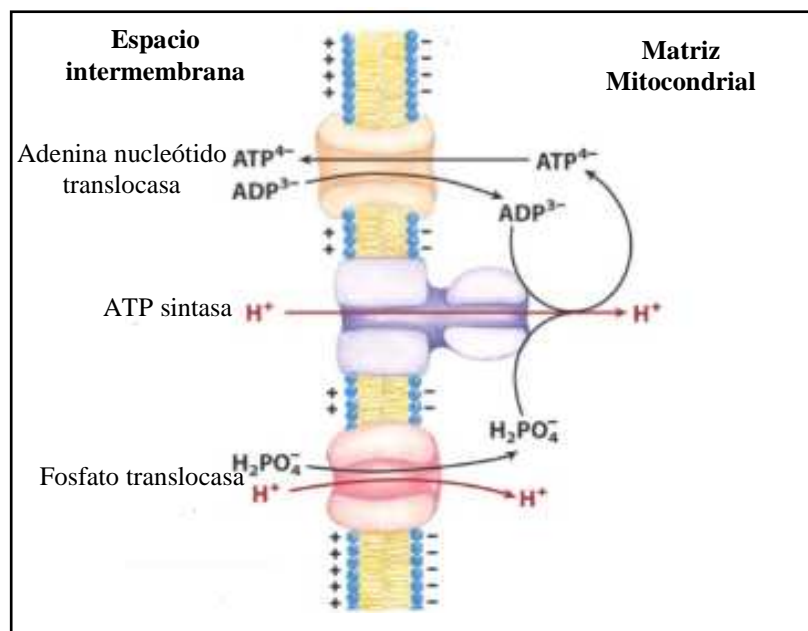


Fig 2.3. Adenina nucleótido y fosfato translocasa. Modificado desde Nelson D. y Cox M. "Lehninger. Principios de Bioquímica", 2008.

Oxidasa alternativa

La cadena respiratoria de las plantas, hongos, algas y protozoarios posee varias diferencias con la cadena respiratoria presente en mamíferos. En estos organismos, los equivalentes de reducción transportados por el NADH además de ingresar a la cadena a través del complejo I, pueden ser captados por dos NAD(P)H deshidrogenasas que no

asocian el transporte electrónico con el bombeo de protones al espacio intermembrana, y no son afectadas por los inhibidores del complejo I. Por otro lado, además del complejo IV (citocromo oxidasa), estos organismos poseen una oxidasa terminal adicional denominada **oxidasa alternativa** (AOX), la cual cataliza la oxidación de la ubiquinona y la reducción del O_2 a H_2O . Esta oxidasa se encuentra asociada en la cara interna de la membrana mitocondrial interna y en consecuencia es incapaz de translocar protones al espacio intermembrana. Una característica que permite diferenciar la actividad de AOX con la de citocromo oxidasa es que la oxidasa alternativa es insensible al cianuro.

Las vías alternativas del transporte de electrones, al disipar el gradiente de protones, no contribuyen a la síntesis de ATP, por el contrario, la energía generada en el flujo de electrones se asocia a un incremento en la producción de calor.

La presencia de AOX en tejidos especializados de plantas termogénicas, se relaciona con uno de sus roles fisiológicos más reconocidos: la producción de calor, que se encuentra implicada en los procesos de polinización de éstas plantas. En células y tejidos no termogénicos la actividad de AOX tendría una función metabólica regulada por los niveles de ATP y NADPH. Cuando existen altos niveles de ATP y NADPH, se estimula la actividad de AOX disminuyendo el flujo de electrones hacia la citocromo oxidasa, de esta manera se regularía la producción de energía celular. La actividad de AOX también se ha sugerido que previene la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs).

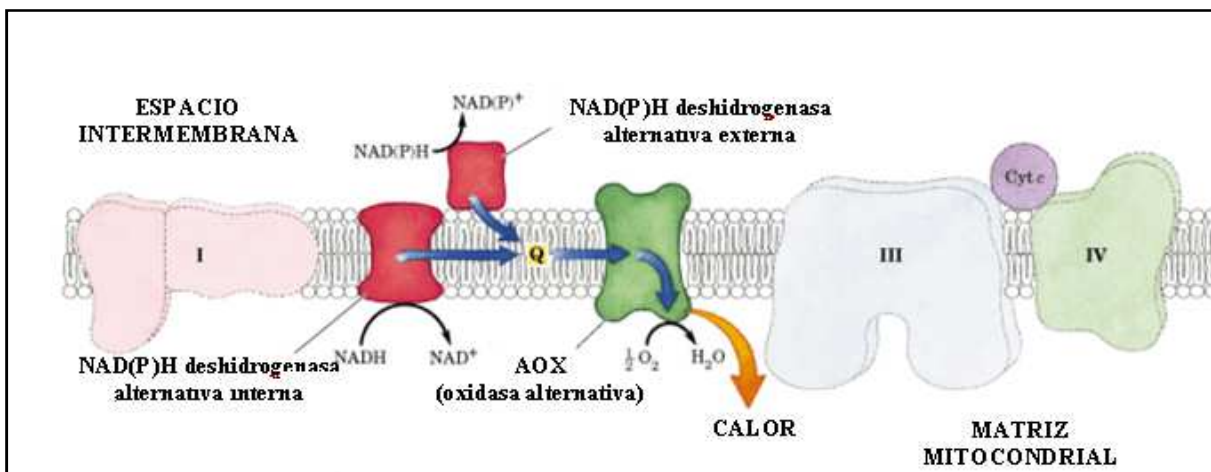


Fig. 2.4 Transporte alternativo de electrones en plantas. Modificado desde Nelson D. y Cox M. "Lehninger. Principios de Bioquímica", 2008.

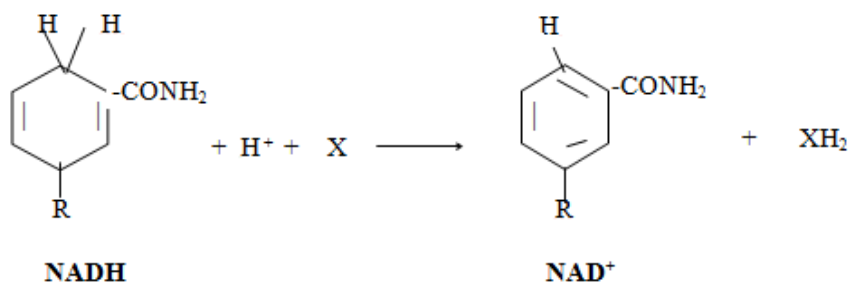
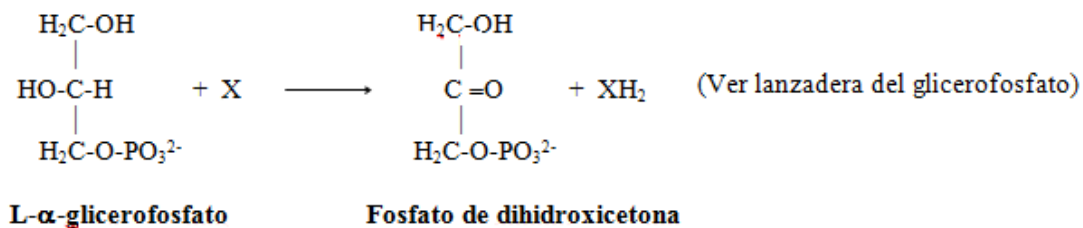
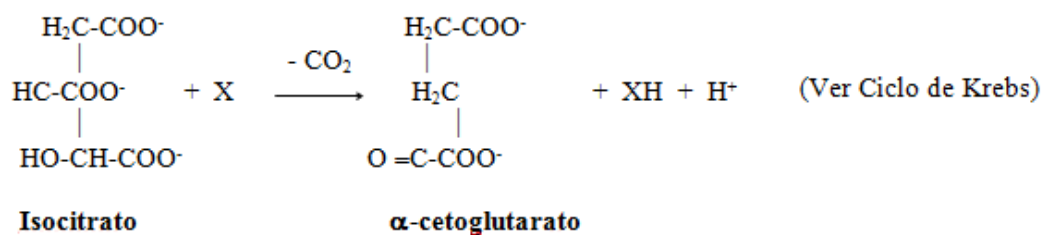
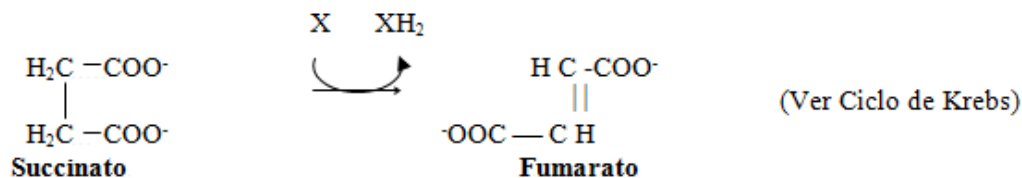
PROBLEMAS A RESOLVER

1) En cada una de las siguientes reacciones mencione:

a) Nombre de la enzima que cataliza la reacción.

b) Naturaleza de X.

c) Indique que especie actúa como oxidante y cual como reductora.



2) ¿Cuál es el efecto de cada uno de los siguientes inhibidores sobre el transporte electrónico y la formación de ATP por la cadena respiratoria?

a) Azida sódica

c) Rotenona

b) Atractilósido

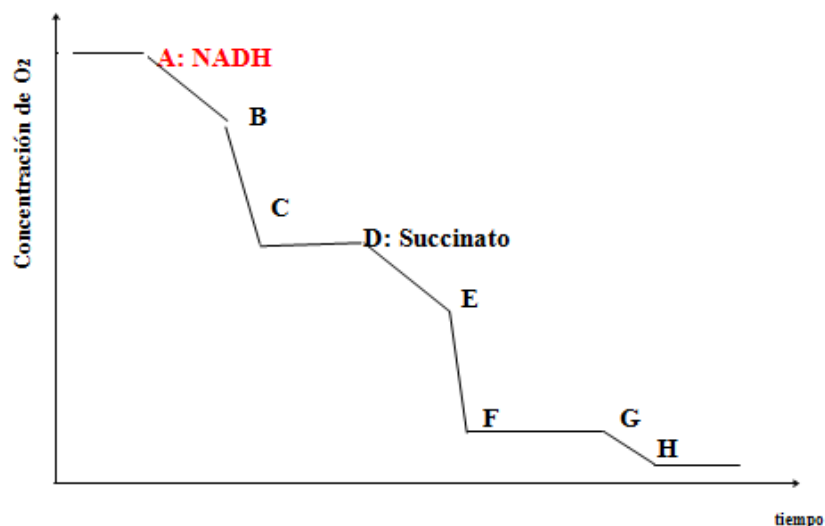
d) Monóxido de carbono (CO)

3) El Cociente respiratorio (QR) es útil para detectar cambios metabólicos en ciertos productos vegetales comestibles, una vez separados de la planta. ¿Cuáles son las reacciones que predominan cuando se determina un aumento del cociente respiratorio?

4) El siguiente gráfico muestra el trazado obtenido en un oxígrafo al incubar partículas submitocondriales a 30°C en un medio a pH 7,5. Caracterice cada uno de los compuestos agregados (B, C, E, F, G, H). Justifique el efecto de cada compuesto sobre la velocidad de consumo de O₂.

B: ADP + Pi u Oligomicina E: 2,4-DNF u Oligomicina G: Malonato o Succinato

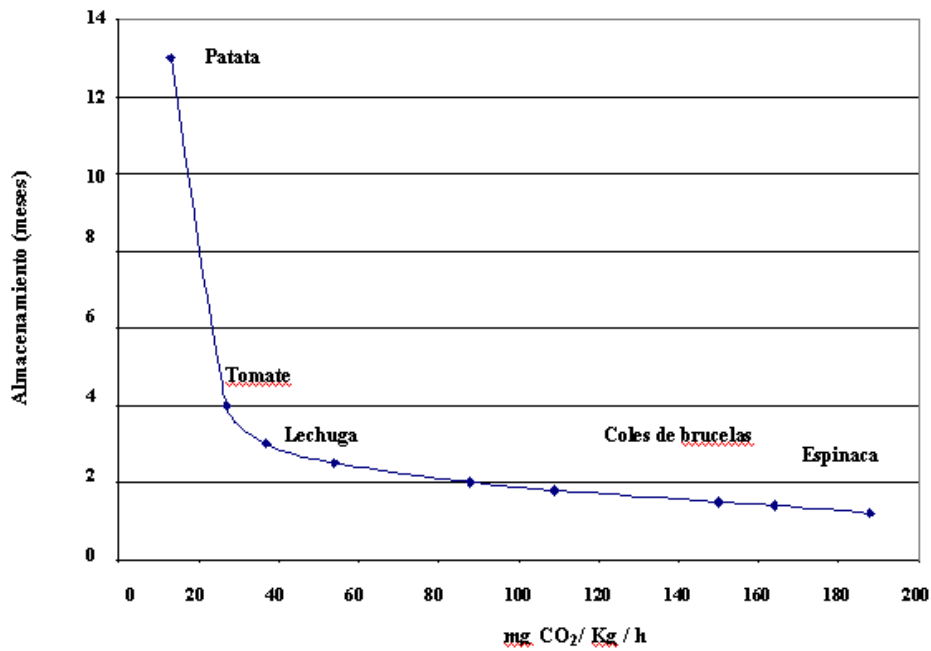
C: Rotenona o Antimicina F: Malonato o Succinato H: CN⁻ o Amital



5) Teniendo en cuenta las pérdidas económicas que pueden ocasionarse después de la recolección de frutas y verduras, se estudió la relación entre la actividad respiratoria y la vida útil de almacenamiento (T= 20°C) para el consumo de las mismas, los resultados se muestran en la próxima gráfica.

a) De acuerdo a los resultados mostrados ¿Cuál es el alimento más perecedero? ¿Por qué?

b) ¿Cómo podría aumentar la vida útil de almacenamiento? ¿Cuál es el fundamento bioquímico del método seleccionado?



6) La actividad metabólica que ocurre en las plantas durante la etapa post-cosecha se relaciona con las reacciones de conservación de la energía a través de la fosforilación oxidativa. Parte de esta actividad se transforma en calor a través de una *cadena de transporte electrónico alternativa*.

- Esquematice las reacciones de oxidación de malato y succinato que ocurre en estos vegetales.
- ¿Cómo actúa la vía alternativa sobre la respiración celular, la producción de ATP y la actividad enzimática?
- ¿Cómo podría demostrar la actividad de esta vía utilizando inhibidores del transporte electrónico?

GUÍA DE ESTUDIO

Transporte electrónico. Fosforilación oxidativa

Localización de las enzimas

- NADH y FADH₂ deshidrogenasas, ubiquinona, citocromos. Clases de enzimas y transportadores.
- ¿Cómo están ubicados los componentes de la cadena respiratoria respecto al valor de su potencial de reducción?
- ¿A qué nivel de la cadena actúan los inhibidores? ¿En qué estado (oxidado o reducido) se encuentran los intermediarios cuando actúan los inhibidores?
- ¿Dónde están ubicados los centros proveedores de energía para la fosforilación?

Fosforilación oxidativa

- Teoría quimiosmótica.

Acción de inhibidores y desacoplantes:

- ¿Cómo actúan las sustancias desacoplantes, los inhibidores del transporte y los ionóforos? Ejemplos de cada uno de ellos.
- En presencia de un desacoplante ¿qué ocurriría respecto a la concentración de Pi, la velocidad de oxidación, el transporte de electrones, la producción de calor, la concentración de ADP mitocondrial, y la relación P/O?
- Cuando un sustrato es oxidado por una deshidrogenasa que posee FAD como grupo prostético ¿cómo es la relación P/O? ¿y en presencia de desacoplantes?
- ¿Qué ocurriría si en el caso anterior el sustrato es oxidado por una deshidrogenasa que posee NAD como coenzima?

Cadena respiratoria en vegetales

- ¿Qué diferencias presenta la cadena respiratoria de plantas con la de animales?
- ¿Qué es la oxidasa alternativa? ¿Cuáles son sus características? ¿Cuáles son las consecuencias de su actividad?

Cociente Respiratorio

- ¿Cómo se define el cociente respiratorio?

- ¿Cómo influye el QR en la conservación de los alimentos?
- ¿Cómo puede modificarse este parámetro?

BIBLIOGRAFÍA

- Feduchi, E., Blasco, I., Romero, C.S. y Yáñez, E. “Bioquímica. Conceptos esenciales”, Ed. Médica Panamericana, Bs. As. (2015). Cap. 7.
Fennema, O., “Química de los Alimentos” 2^{da} ed. Acribia S.A. España (2000).
Nelson D.L., Cox M.M. “Lehninger. Principios de Bioquímica”, Ed. WH Freeman and Company, 5^{ta} ed., Inglaterra (2008).Cap.18.
- Stryer, L., “Bioquímica”, Vol. I y II, Ed. Reverté, 4^{ta} ed., Barcelona (1995).Cap. 21.

TRABAJO PRÁCTICO N° 3

METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO

OBJETIVOS

- ✚ Estudiar el metabolismo de carbohidratos en los alimentos.
- ✚ Comprender el funcionamiento y la regulación de la vía glicolítica.
- ✚ Conocer el metabolismo de glucógeno y su regulación hormonal.

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Los hidratos de carbono o carbohidratos proveen la mayor parte de las calorías de la dieta, adicionalmente proporcionan también texturas deseables, palatabilidad agradable y el universalmente reconocido poder edulcorante.

De todos los polisacáridos existentes en la naturaleza, el hombre es capaz de digerir almidón y glucógeno. El glucógeno es similar a la amilopectina del almidón, aunque está más ramificado, y constituye la reserva energética de los organismos animales. La celulosa, hemicelulosa y pectina, presentes en los vegetales, no pueden ser hidrolizadas por el hombre debido a que éste no sintetiza la enzima *celulasa*, necesaria para la degradación de dichos polisacáridos. El grupo de oligosacáridos no digeribles en la dieta es denominado “fibra dietética”.

Los carbohidratos en los alimentos

Los carbohidratos se encuentran en casi todas las plantas terrestres y marinas, y están presentes en granos, frutas y otros órganos vegetales consumidos por el hombre. La mayor parte de estos carbohidratos utilizados por el hombre para su alimentación son el almidón y la sacarosa. Los cereales contienen muy poca cantidad de monosacáridos, dado que la mayor parte de los mismos es transportada a la semilla y convertida en almidón.

Los productos de origen animal contienen menos carbohidratos metabolizables que los de origen vegetal.

Funciones de monosacáridos y oligosacáridos en los alimentos.

Las principales funciones que cumplen los monosacáridos y oligosacáridos en los alimentos son:

- a) Hidrofilia: la capacidad de ligar agua y el control de la actividad de agua de los alimentos es una de las propiedades más importantes de los carbohidratos. Por ej.: La

fructosa es mucho más higroscópica que la D-glucosa. Los azúcares impuros generalmente absorben más agua y a mayor velocidad que los azúcares puros.

b) Fijación de aromas: en muchos alimentos, de modo especial aquéllos sujetos a eliminación de agua, los carbohidratos pueden jugar un importantes papel en la fijación de los colores y los componentes volátiles del aroma.

c) Poder edulcorante: el poder edulcorante de los carbohidratos de bajo peso molecular es una de sus propiedades más reconocida y agradable. La percepción de la dulzura de los azúcares varía con su constitución, configuración y estado físico.

Vía glicolítica

La glicólisis (figura 3.2) es una ruta central, casi universal del catabolismo de la glucosa, no solamente en animales y plantas sino también en muchos microorganismos. En todas las células el metabolismo de los hidratos de carbono produce en primera instancia piruvato, lo cual implica la formación de intermediarios fosforilados y obtención de una cantidad limitada de ATP.

En *aerobiosis* el piruvato producido en la glicólisis ingresa en las mitocondrias siendo oxidado allí a CO_2 y H_2O , y el NADH formado por la oxidación del gliceraldehído-3-P, se reoxida a NAD^+ tras ceder sus equivalentes de reducción (vía lanzaderas) a la cadena de transporte electrónico.

En *anaerobiosis* el NAD^+ es regenerado mediante reacciones que implican la reducción del piruvato en diferentes compuestos (lactato, etanol, acetato) de acuerdo al tipo celular. Estos procesos son conocidos en general como fermentaciones y no están asociados a la producción de ATP.

La fermentación láctica se lleva a cabo, por ejemplo, cuando los tejidos animales no tienen un aporte de oxígeno suficiente para mantener la oxidación aeróbica. También es importante en eritrocitos y otros tipos celulares carentes de mitocondrias. Además numerosos microorganismos son capaces de llevar a cabo esta fermentación, algunos de los cuales dan lugar a la formación de productos que son utilizados comercialmente.

Las levaduras y otros microorganismos realizan la fermentación alcohólica, donde el piruvato es transformado en etanol en un proceso que implica dos pasos catalizados por dos enzimas diferentes.

La fermentación acética es la oxidación bioquímica del etanol, llevada a cabo por un grupo de bacterias conocidas como bacterias acéticas, de las cuales las bacterias del

género *Acetobacter* son las más utilizadas a escala industrial. Este proceso no es en sentido estricto una fermentación, ya que requiere de un elevado aporte de oxígeno. Las bacterias acéticas son muy susceptibles a la falta de oxígeno, situación que conduce no sólo a una disminución del metabolismo celular sino también a la muerte de las bacterias por acumulación de acetaldehído.

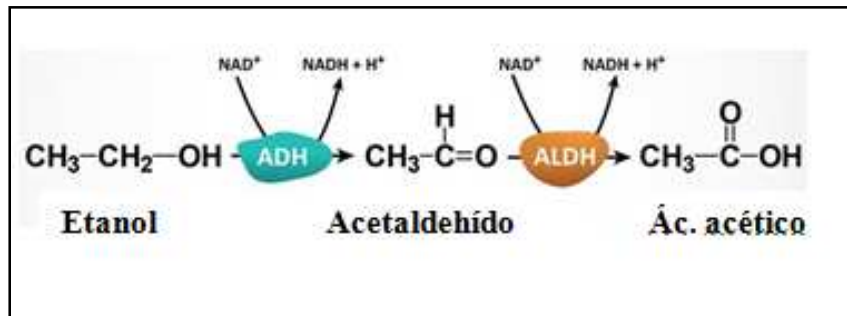
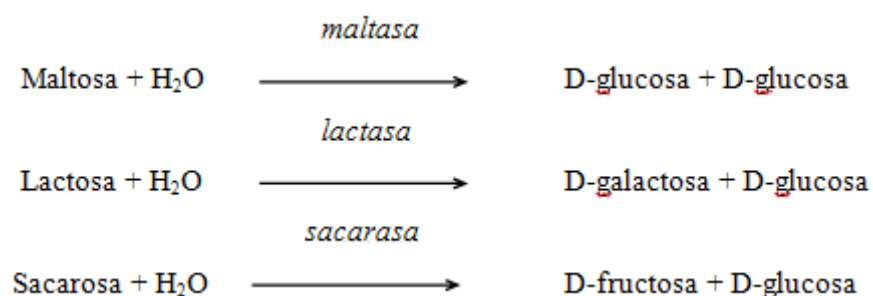


Figura 3.1. Reacciones químicas implicadas en la fermentación acética. ADH: alcohol deshidrogenasa. ALDH: acetaldehído deshidrogenasa.

Rutas de “alimentación” que conducen desde glucógeno y otros carbohidratos a la vía glicolítica

Además de la glucosa, numerosos carbohidratos se incorporan en último término a la vía glicolítica para experimentar degradación que rinde energía (figura 3.2 y figura 3.3). Estos carbohidratos son metabolizados hasta ser transformados en algún intermediario de la vía glicolítica. Los más significativos son los polisacáridos de almacenamiento glucógeno y almidón, los disacáridos maltosa, sacarosa y lactosa, y los monosacáridos fructosa, galactosa y manosa.

Los disacáridos, maltosa, sacarosa y lactosa, no pueden ser incorporados directamente a la vía glicolítica. Una vez ingeridos deben experimentar hidrólisis enzimática en las células que recubren las paredes del intestino delgado y transformarse en unidades de hexosa. Los monosacáridos así formados son absorbidos, alcanzan la circulación sanguínea y luego pasan al hígado en donde se convierten en intermediarios de la vía glicolítica tal como se describió anteriormente.



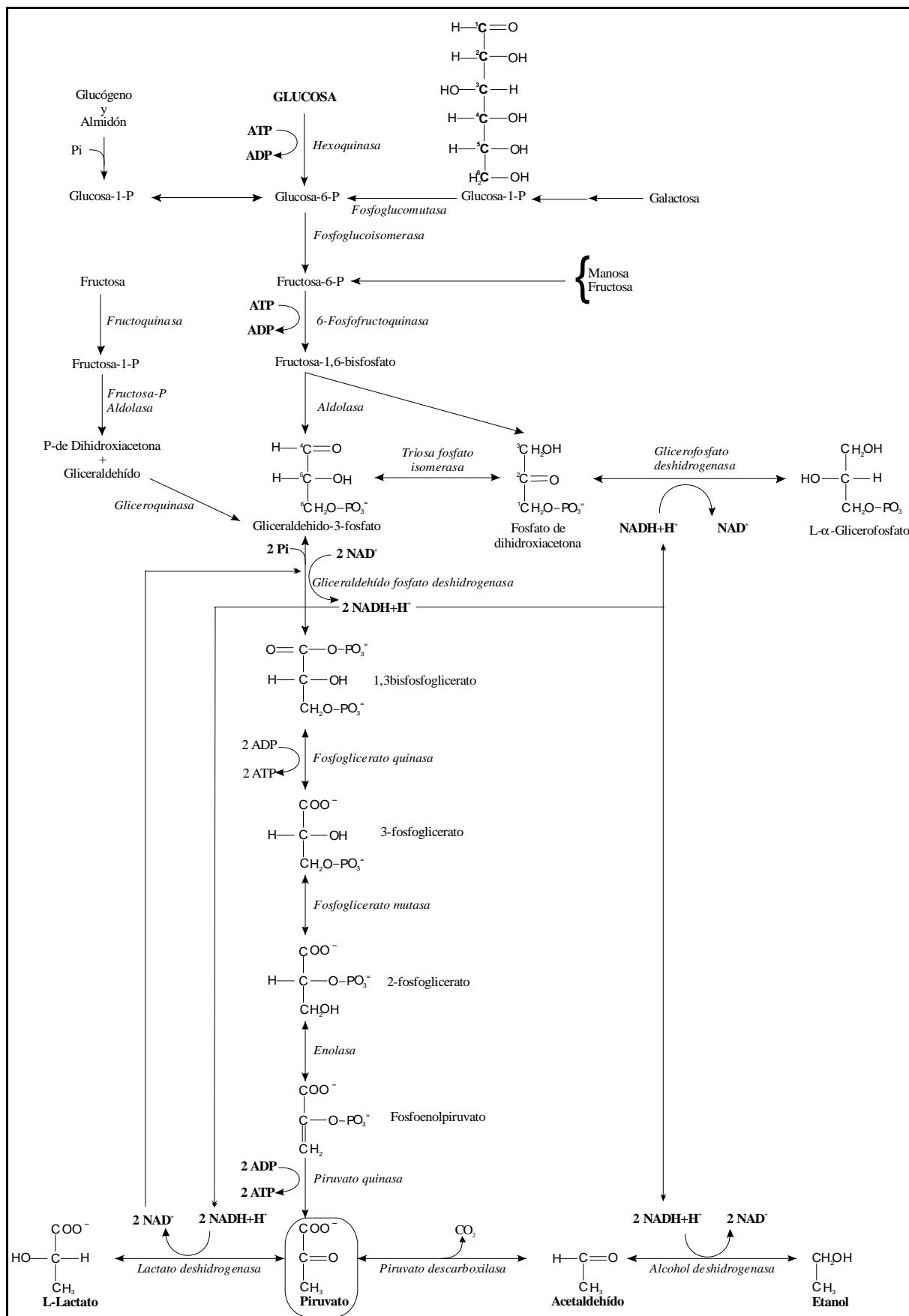


Fig. 3.1. Esquema de la vía glicolítica, rutas de alimentación de esta vía y destino del piruvato según las condiciones de oxígeno.

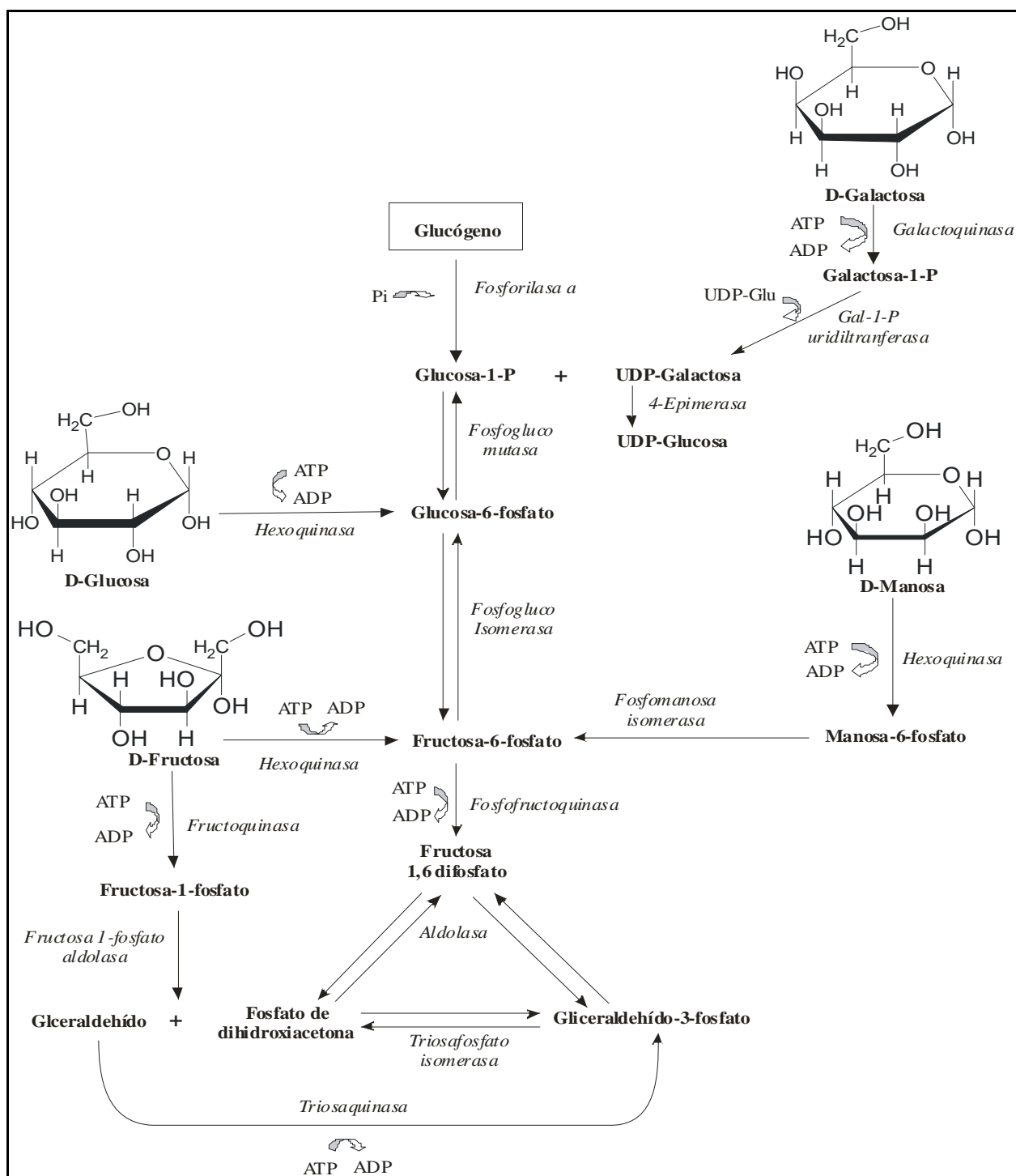


Fig. 3.3. Esquema de la incorporación de diferentes carbohidratos a la vía glicolítica.

Puntos de Regulación de la Glicólisis

Como en todas las rutas metabólicas la velocidad de la glicólisis está sujeta a control, el cual se realiza en tres etapas, donde están involucradas tres reacciones químicas irreversibles:

1° Punto de Control: a nivel de la *Hexoquinasa*. La actividad de la enzima es regulada por la concentración de su principal producto, la glucosa-6-fosfato, el cual modula negativamente la actividad de la enzima.

2° Punto de Control: a nivel de la *Fosfofructoquinasa* la cual es una enzima alostérica. Su actividad es regulada por varios efectores. Son moduladores alostéricos positivos de la actividad de esta enzima el **ADP** y el **AMP**, y negativos el **ATP**, **NADH**, **citrato** y **los ácidos grasos de cadena larga**. Este es el principal punto de control de la vía glicolítica.

3° Punto de Control: a nivel de la *Piruvato quinasa*. Esta enzima alostérica que posee varias isoenzimas, es modulada positivamente por la fructosa-1,6- bifosfato y negativamente por el **ATP**, **acetil-CoA** y **ácidos grasos de cadena larga**, entre otros. La isoenzima hepática también es regulada por fosforilación reversible.

PROBLEMAS A RESOLVER

1) En dos tubos diferentes se incubaron extractos celulares de músculo de conejo (tubo A) y de levaduras (tubo B) con fosfato y glucosa marcada isotópicamente con ^{14}C en forma uniforme, en un medio anaeróbico con azida sódica (NaN_3) a $\text{pH}=5$ y a 30°C . Las medidas de radiactividad, en alícuotas iguales de medio, antes de agregar las células ($t=0$) y luego de 1h de incubación se muestran en la siguiente tabla:

t (min)	% de radiactividad	
	tubo A	tubo B
0	100	100
60	98	65

- a) ¿Qué explicación encuentra para estos resultados?
- b) Construya una tabla con los valores teóricos de % de radiactividad que esperaría encontrar si el experimento se realizara en idénticas condiciones pero con 1- ^{14}C glucosa.

2) Al añadir O_2 a una suspensión anaeróbica de células que utilizan glucosa a una velocidad elevada, la velocidad de consumo de glucosa desciende de manera espectacular a medida que se consume el O_2 agregado. Además, al mismo tiempo cesa la producción de lactato. Este comportamiento celular, conocido como efecto Pasteur, fue observado primeramente por Luis Pasteur en la década de 1860 y es característico de la mayoría de células capaces de utilizar la glucosa tanto en forma aeróbica como anaeróbica.

- a) ¿Por qué cesa la acumulación de lactato, después de la adición de O_2 ?
- b) ¿Por qué la presencia de O_2 , disminuye la velocidad de consumo de glucosa?
- c) Explique lo anterior en función de enzimas específicas.

3) Predecir si la adición de cantidades significativas de los compuestos que se especifican a continuación podría provocar un incremento (+), disminución (-), o no inducir ningún cambio en la velocidad de conversión de glucosa en etanol. ¿Cuál es su modo de acción?

- | | | |
|--------|----------------|-------------|
| a) ADP | c) citrato | e) fluoruro |
| b) ATP | d) iodoacetato | |

4) La salsa de soja se prepara fermentando una mezcla salada de semillas de soja y trigo junto con varios microorganismos, incluyendo la levadura, durante un período de 8 a 12 meses. La salsa resultante (después de eliminar los sólidos) es rica en lactato y etanol.

- ¿Cómo se forman estos dos productos?
- Es necesario eliminar el oxígeno del tanque de fermentación para que la salsa de soja no tenga un fuerte sabor a vinagre (el vinagre es ácido acético diluido). ¿Por qué?

5) Cierta grupo de individuos presenta intolerancia a la absorción de la lactosa debido a una deficiencia de la enzima β -galactosidasa (lactasa) intestinal. Siendo la leche y los productos lácteos una excelente fuente de alimentos para remediar la deficiencia dietética a nivel mundial:

- Proponga una metodología, con base bioquímica, que pudiera utilizarse a nivel industrial para que los individuos en cuestión utilicen estos productos en su dieta.
- ¿Qué metodología adicional podría aplicarse para que dicho producto fuera utilizado por personas que presentan intolerancia a la galactosa?
- Sugiera algunas determinaciones de laboratorio para evaluar la eficacia de las metodologías propuestas en a) y b)

6) La principal fuente dietética de fructosa es el disacárido sacarosa, utilizado como principal edulcorante natural, presente en la miel y las frutas.

Existen distintos tipos de trastorno del metabolismo de la fructosa:

- a) Deficiencia en la enzima *fructoquinasa*.
- b) Deficiencia de la *fructosa-1P-aldolasa*.

Los individuos con esta última deficiencia tienen intolerancia a la fructosa. Teniendo en cuenta lo expuesto:

- a) Realice el esquema de las dos reacciones involucradas.
- b) ¿De qué manera la industria alimentaria puede aportar una solución a este problema?

7) La manufactura de chocolates que contienen un relleno líquido es una de las interesantes aplicaciones de la ingeniería de enzimas. El relleno líquido aromático es básicamente una disolución acuosa de azúcares rica en fructosa para endulzar su sabor. El dilema técnico es el siguiente: el recubrimiento de chocolate debe prepararse vertiendo chocolate fundido y caliente sobre un núcleo sólido (o casi sólido), pero sin embargo el producto final debe tener un centro (relleno) líquido y rico en fructosa. Sugerir un modo de solucionar este problema. Tenga en cuenta que fructosa es mucho más soluble que sacarosa (solubilidad en agua a 20°C, fructosa: 375 g/100 ml, sacarosa: 203,9 g/100 ml).

GUÍA DE ESTUDIO

Vía glicolítica:

- Esquema con fórmulas de las reacciones, enzimas y cofactores.
- ¿En qué lugar de la célula se encuentran las enzimas que catalizan las reacciones de la vía glicolítica?
- Acción de la hexoquinasa y de la glucoquinasa: sustrato sobre el cual actúan, producto de la reacción que catalizan. Diferencia en los valores de K_m .
- ¿Cuáles son los monosacáridos más comunes que pueden ingresar a la vía glicolítica?
- ¿Cómo se incorporan a la vía los disacáridos?

Regulación:

- ¿Qué compuestos activan o inhiben las tres enzimas que intervienen en la regulación?
- Balance energético.



Destino del piruvato:

- Fermentación láctica, alcohólica y acética.
- Efecto Pasteur

BIBLIOGRAFÍA

- Blanco, A., “Química Biológica”, Ed. El Ateneo, 8^{va} ed., Bs. As. (2006).Cap.11.
- Fennema, O., “Química de los Alimentos” 2^{da} ed. Acribia S.A. España (2000), Cap. 6.
- Nelson D.L., Cox M.M. Lehninger. Principios de Bioquímica, Ed. WH Freeman and Company, 5^{ta} ed., Inglaterra (2008). Cap.14.

TRABAJO PRÁCTICO N° 4

CICLO DE KREBS- VÍA DE LAS PENTOSAS FOSFATO-METABOLISMO DE POLISACÁRIDOS

OBJETIVOS

- + Adquirir conocimientos sobre el Ciclo de Krebs: enzimas implicadas, puntos de regulación, balance energético.
- + Conocer la secuencia de reacciones de la vía de las pentosas, destino de los productos (NADPH, ribosa-5-fosfato), interrelaciones con la vía glicolítica, su regulación y su importancia en los alimentos.
- + Conocer y comprender el metabolismo de los polisacáridos y su relación con las principales vías metabólicas de los carbohidratos.

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

El ciclo de Krebs o ciclo de los ácidos tricarboxílicos, es una secuencia de reacciones que constituye la ruta central común para la degradación de los restos carbonados que, en forma de acetil-coenzima A (acetil-CoA), derivan del catabolismo de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos. Estas secuencias de reacciones enzimáticas tienen lugar únicamente en los organismos aerobios.

El ciclo está catalizado por un sistema multienzimático que acepta como combustible al grupo acetilo de la acetil-CoA, degradándolo hasta CO_2 y pares de H^+ y e^- . Estos últimos son conducidos a través de una cadena de transportadores hasta el O_2 , que actúa como aceptor final en la mayoría de los organismos, el cual se reduce y forma H_2O , en lo que se denomina “cadena respiratoria”.

Descarboxilación oxidativa del piruvato

El piruvato obtenido en la vía glicolítica en el citosol, en condiciones aeróbicas ingresa a la matriz mitocondrial a través de un transportador de la membrana interna de estas organelas, donde será metabolizado a acetil-CoA (figura 4.1) por el complejo multienzimático de la *piruvato deshidrogenasa*. Este complejo está constituido por tres enzimas: *piruvato descarboxilasa* o E_1 , *dihidrolipoil transacetilasa* o E_2 , y *dihidrolipoil deshidrogenasa* o E_3 , y requiere de cinco coenzimas: pirofosfato de tiamina, ácido lipoico, coenzima A, FAD y NAD.

El NADH producido en esta reacción transfiere los electrones a la cadena respiratoria donde se unen a oxígeno para dar agua, en el proceso se obtienen 3 ATP desde ADP.

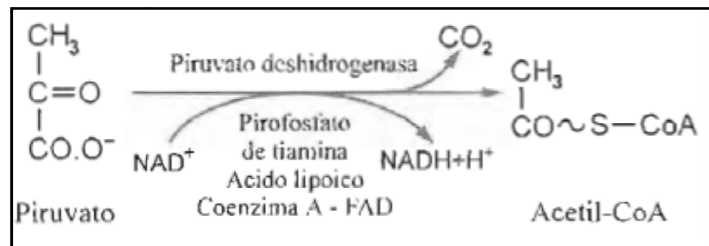


Fig. 4.1. Descarboxilación oxidativa de piruvato, catalizada por la piruvato deshidrogenasa. Blanco, A., “Química Biológica”, 2006.

Enzimas del ciclo de Krebs

Además del complejo de la piruvato deshidrogenasa, que cataliza la descarboxilación oxidativa del piruvato para obtener acetil-CoA, en el ciclo propiamente dicho actúan secuencialmente las siguientes ocho enzimas:

- 1- Citrato sintasa o enzima condensante
- 2- Aconitasa
- 3- Isocitrato deshidrogenasa
- 4- α -cetoglutarato deshidrogenasa
- 5- Succinil-CoA sintetasa o Succinato tioquinasa
- 6- Succinato deshidrogenasa
- 7- Fumarasa
- 8- Malato deshidrogenasa

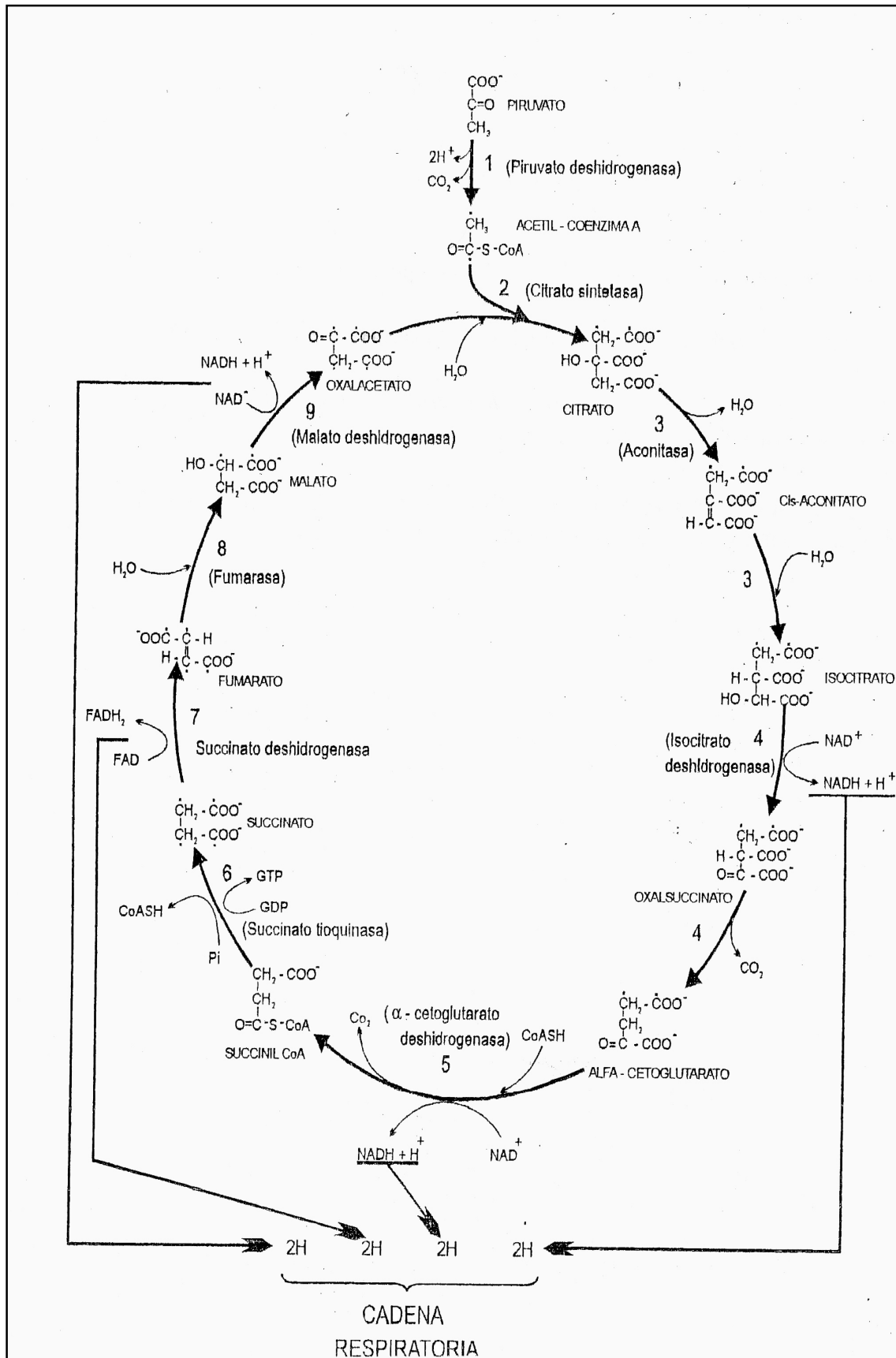


Fig. 4.2. Esquema de las reacciones químicas involucradas en el ciclo de Krebs. Modificado desde Nelson D.L. and Cox M.M., "Lehninger. Principios de Bioquímica", 2008.

Función anaplerótica del ciclo de Krebs

Varios de los intermediarios del ciclo de Krebs están relacionados con otras vías metabólicas, sirviendo de puntos de entrada de sustratos al ciclo y asegurando una adecuada concentración de intermediarios.

A su vez, estas relaciones metabólicas posibilitan el aporte de intermediarios del ciclo de Krebs, que actúan como precursores en distintos procesos anabólicos. El ciclo es, por lo tanto, una vía anfibólica.

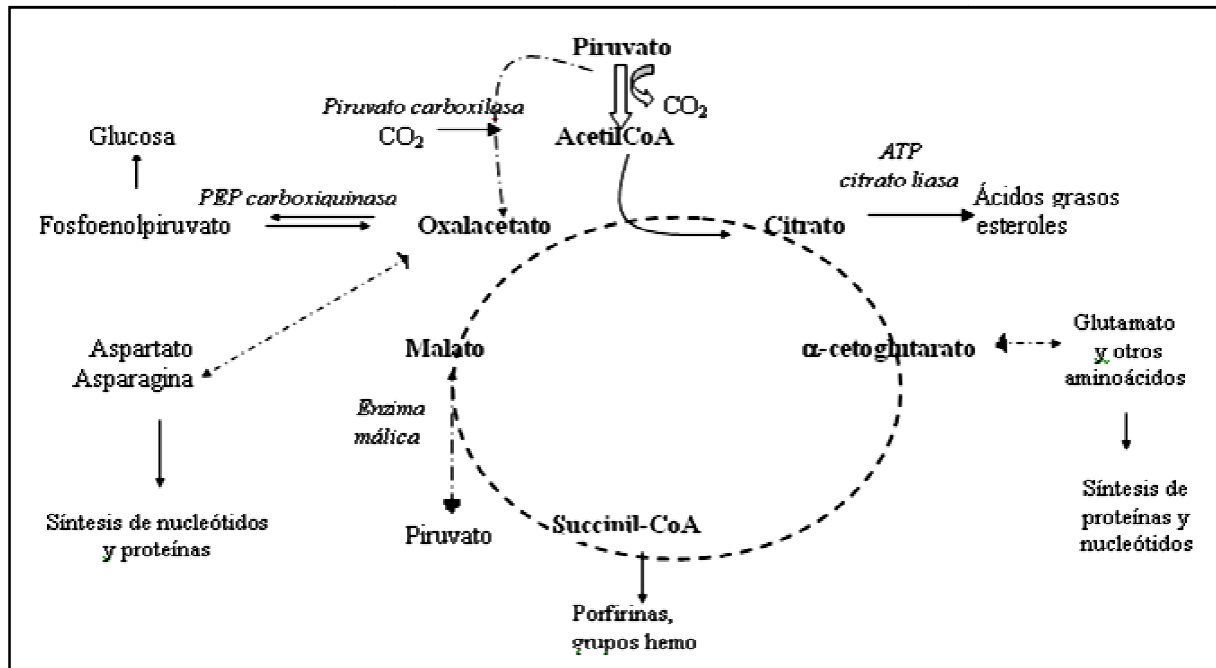


Fig. 4.3. Funciones anapleróticas del ciclo de Krebs. Los intermediarios del ciclo de Krebs salen del mismo para actuar como precursores de muchas rutas biosintéticas, dando lugar a productos que se indican con flechas de líneas continuas (—→). Indicadas con flechas de líneas cortadas (- - - ->), se muestran cuatro reacciones anapleróticas que permiten reponer intermediarios consumidos en el ciclo.

Regulación del Ciclo de Krebs

El ciclo de Krebs está controlado **indirectamente** por el complejo de la piruvato deshidrogenasa, el cual está regulado mediante fosforilación reversible (figura 4.4). Además el complejo es inhibido por ATP, acetil-CoA y NADH, y es estimulado por insulina y el Ca^{++} (este último aumenta en el ejercicio muscular intenso y estimula a una fosfatasa que actúa sobre la piruvato deshidrogenasa).

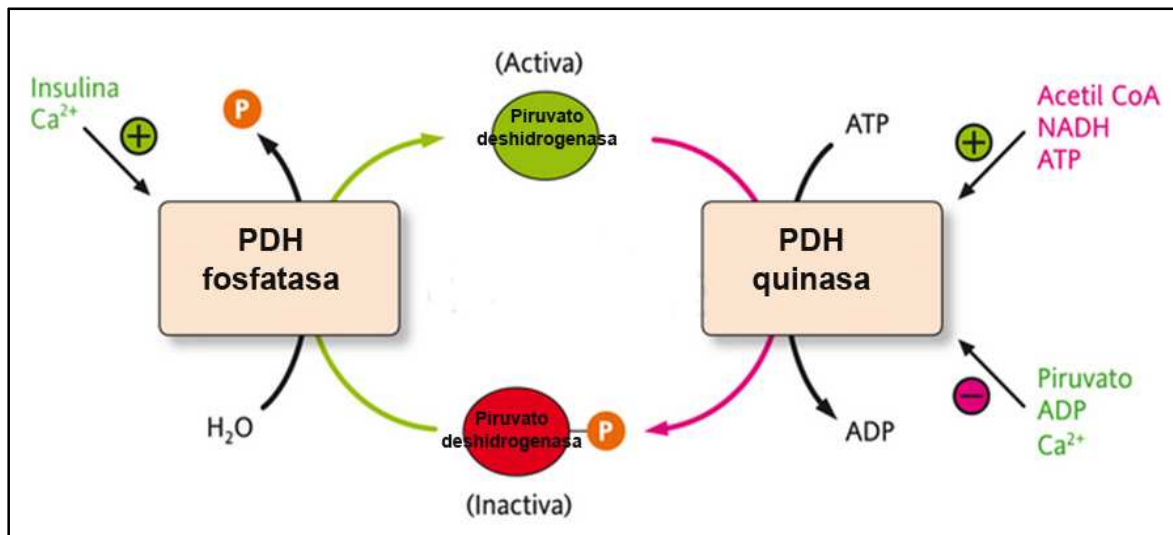


Fig. 4.4. Regulación de la actividad del complejo de la piruvato deshidrogenasa. Feduchi, Blasco, Romero, Yañez. "Bioquímica. Conceptos esenciales", 2015.

El funcionamiento del ciclo de Krebs depende del flujo de átomos de carbono. Dicho flujo implica la conversión de piruvato en acetil-CoA (reacción catalizada por *piruvato deshidrogenasa*) y la entrada del acetil-CoA al ciclo. Sin embargo, el acetil-CoA además de tener su origen en la reacción catalizada por la *piruvato deshidrogenasa*, puede provenir de la oxidación de ácidos grasos y del catabolismo de algunos aminoácidos.

Los tres factores que gobiernan el flujo de carbonos a través del ciclo de Krebs son:

- Disponibilidad de sustrato.
- Inhibición del ciclo por acumulación de producto.
- Retroinhibición alostérica de enzimas que catalizan las primeras etapas del ciclo.

Los principales sitios de regulación son pasos fuertemente exergónicos y son los catabolizados por *citrato sintasa*, *isocitrato deshidrogenasa* y *α -cetoglutarato deshidrogenasa*.

1° punto de control: *citrato sintasa*

La actividad de la enzima es regulada por la disponibilidad de sustrato (acetil-CoA y oxalacetato). Responde a los siguientes reguladores:

- Inhibidores: succinil-CoA (compite con acetil-CoA por el sitio activo), citrato y ATP
- Activadores: ADP.

2° punto de control: isocitrato deshidrogenasa

- Inhibidores: ATP y NADH. La actividad de la enzima es fuertemente regulada por los niveles de NADH (cuando la relación NADH/NAD^+ es alta, la enzima se inhibe).
- Activadores: Ca^{2+} (en músculo).

3° punto de control: α -cetoglutarato deshidrogenasa

- Inhibidores: relación NADH/NAD^+ elevada, succinil-CoA.
- Activadores: Ca^{2+} (en músculo).

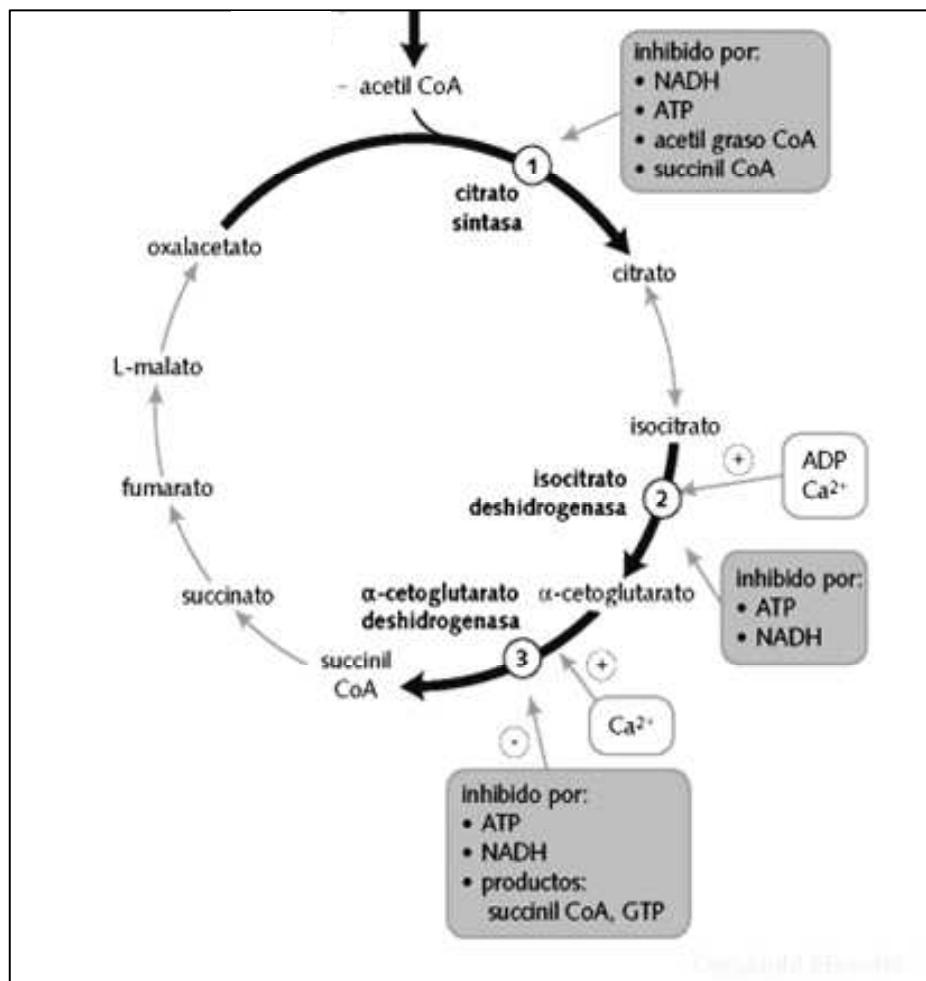


Fig. 4.5. Regulación directa del Ciclo de Krebs.
Benyon S., “Lo esencial en Metabolismo y Nutrición”, 2010.

VÍA DE LAS PENTOSAS FOSFATO

La **glucosa-6-fosfato** puede ser catabolizada por la “vía de las pentosas-fosfato”, una ruta alternativa para el metabolismo de la glucosa, que ocurre en el citoplasma celular. Los objetivos fundamentales de esta vía son: formación de NADPH y síntesis de ribosa-5-fosfato. El **NADPH** es el principal agente reductor de la célula, utilizado principalmente en procesos de biosíntesis (síntesis de ácidos grasos, colesterol, esteroides, etc) y detoxificación celular. La **ribosa-5-fosfato** es necesaria para la síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos.

Esta vía posibilita la interconversión de varios carbohidratos de 3, 4, 5, 6 y 7 átomos de carbono, algunos de los cuales son también intermediarios de la vía glicolítica. (gliceraldehído-3-fosfato y fructosa-6-fosfato). Para comprender las reacciones que tienen lugar en esta vía se consideran dos fases: Fase oxidativa (reacciones irreversibles) y Fase no oxidativa (reacciones reversibles).

- **Fase Oxidativa:**

Esta fase consta de tres reacciones irreversibles, dando como resultado la formación de ribulosa-5-P, CO_2 , y dos moléculas de NADPH por molécula de glucosa-6-P que se oxida.

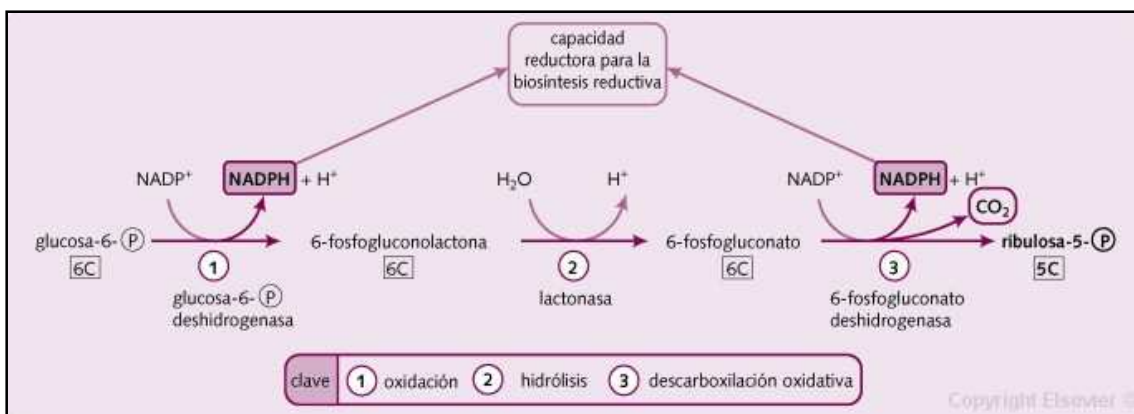


Fig 4.6. Fase oxidativa de la vía de las pentosas fosfato.
Lim, Roach. “Lo esencial en metabolismo y nutrición”, 2010.

La *glucosa-6-fosfato deshidrogenasa* y la *6-fosfogluconato deshidrogenasa* son dos enzimas que actúan como oxido-reductasas, utilizando como coenzima el NADP oxidado. La *glucosa-6-fosfato deshidrogenasa* es la enzima reguladora de la vía de las pentosas fosfato, siendo inhibida por uno de sus productos: el NADPH.

- **Fase no oxidativa**

Esta etapa consta de una serie de cinco reacciones reversibles donde ocurren interconversiones desde ribulosa-5-P a ribosa-5-P para la síntesis de nucleótidos, o a intermediarios de la glucólisis tales como gliceraldehído-3-P o fructosa-6-P.

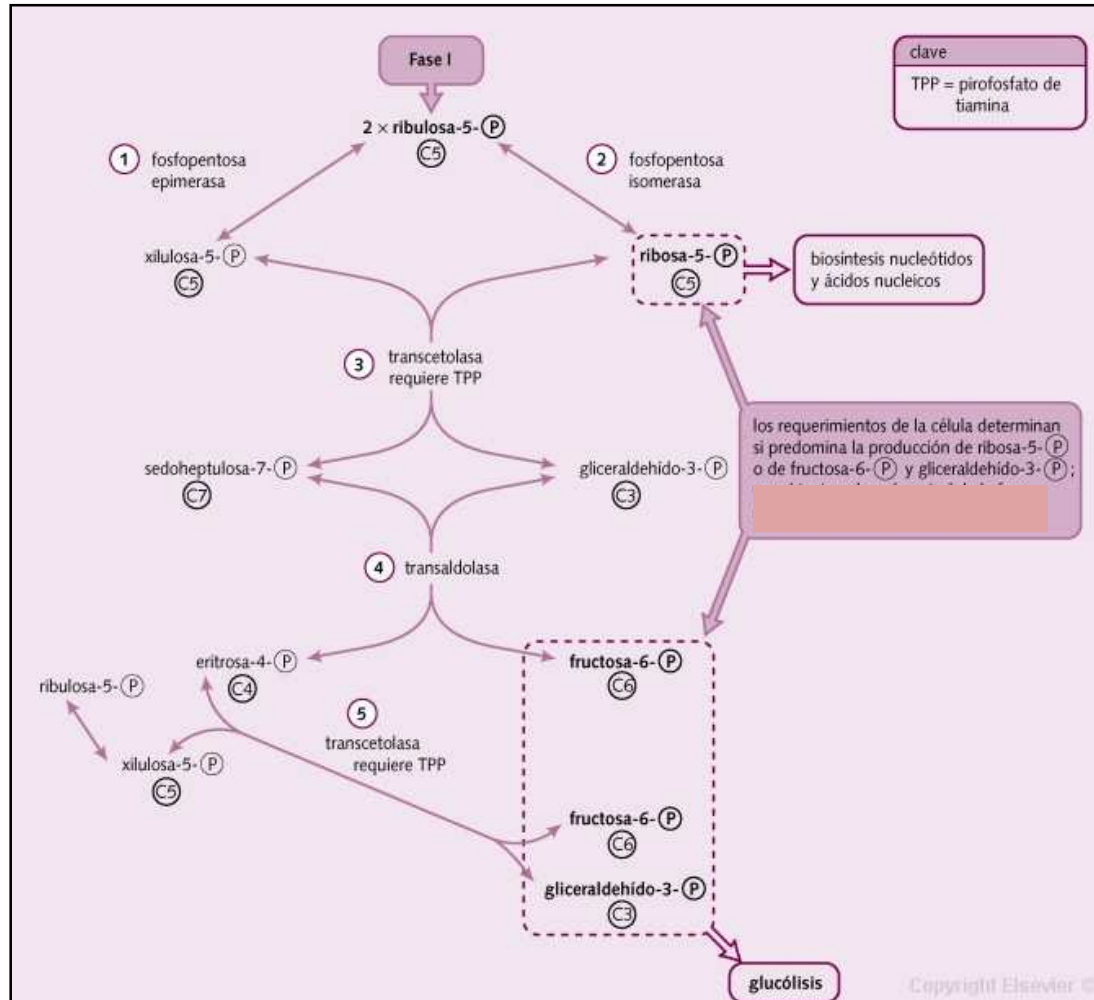


Fig 4.7 Fase no oxidativa de la vía de las pentosas-fosfato. Lim, Roach. “Lo esencial en metabolismo y nutrición”, 2010.

En esta fase se producen una heptosa (7 C, pseudoheptulosa-7-P), una hexosa (fructosa-6-P), dos pentosas (ribosa-5-P y xilulosa-5-P), una tetrosa (eritrosa-4-P) y una triosa (gliceraldehído-3-P). Intervienen dos enzimas que transportan unidades de tres o dos carbonos, la *transaldolasa* y *transcetolasa*, respectivamente. Esta última enzima requiere como cofactor pirofosfato de tiamina (PPT).

METABOLISMO DE POLISACÁRIDOS

Metabolismo del glucógeno

En el hígado el glucógeno sirve como depósito de glucosa. Por degradación del glucógeno se libera glucosa la cual pasa a la sangre para su distribución a otros tejidos. Por el contrario, en el músculo el glucógeno se degrada para proporcionar energía en forma de ATP para la contracción muscular.

a) Glucogenogénesis (síntesis de glucógeno)

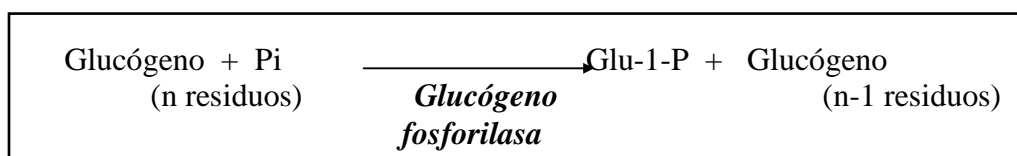
La formación de glucógeno a partir de glucosa se realiza en muchos tejidos, principalmente hígado y músculo. Es un proceso anabólico que requiere energía y está regulado principalmente por la enzima *glucógeno sintasa*. El sustrato para la síntesis es la glucosa activada con UDP (figura 4.8).

b) Glucogenólisis (degradación del glucógeno)

El glucógeno es una forma de almacenamiento de glucosa, fácilmente movilizable a través del proceso denominado glucogenólisis. En este proceso intervienen enzimas diferentes a la vía anabólica siendo la enzima reguladora la *glucógeno fosforilasa*.

La glucogenólisis se lleva a cabo por la acción secuencial de dos enzimas la *glucógeno-fosforilasa* y la *fosfoglucomutasa*, produciéndose primero la eliminación secuencial de residuos de glucosa-1-fosfato (glu-1-P) desde el extremo no reductor de la molécula de glucógeno, y luego la conversión a glucosa-6-fosfato por acción de la mutasa (figura 4.8).

La glucógeno-fosforilasa cataliza la reacción general:



Esta enzima que se halla en el músculo e hígado, constituye un importante ejemplo de enzima reguladora modulada por modificación covalente, con interconversión entre sus formas activa e inactiva (figura 4.9). La glu-1-P así formada puede degradarse hasta ácido láctico en el músculo o transformarse en glucosa libre en el hígado.

La *glucógeno sintasa* y *glucógeno fosforilasa* están reguladas en forma recíproca por un ciclo de fosforilación-desfosforilación, cuando se estimula una enzima se inhibe la otra.

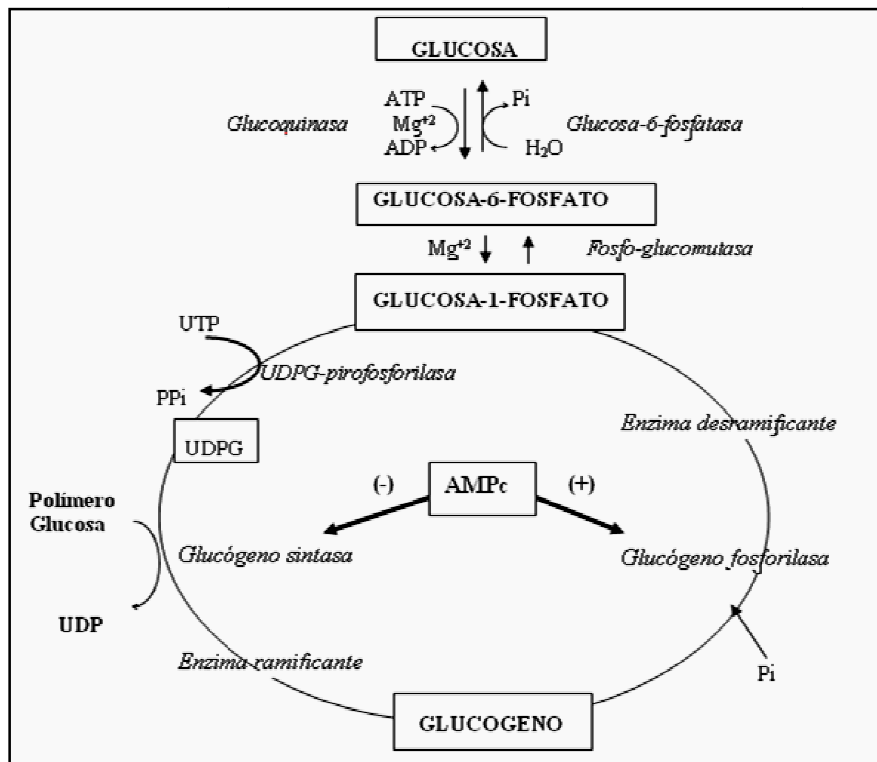


Fig. 4.8. Esquema de las reacciones involucradas en el metabolismo de glucógeno.

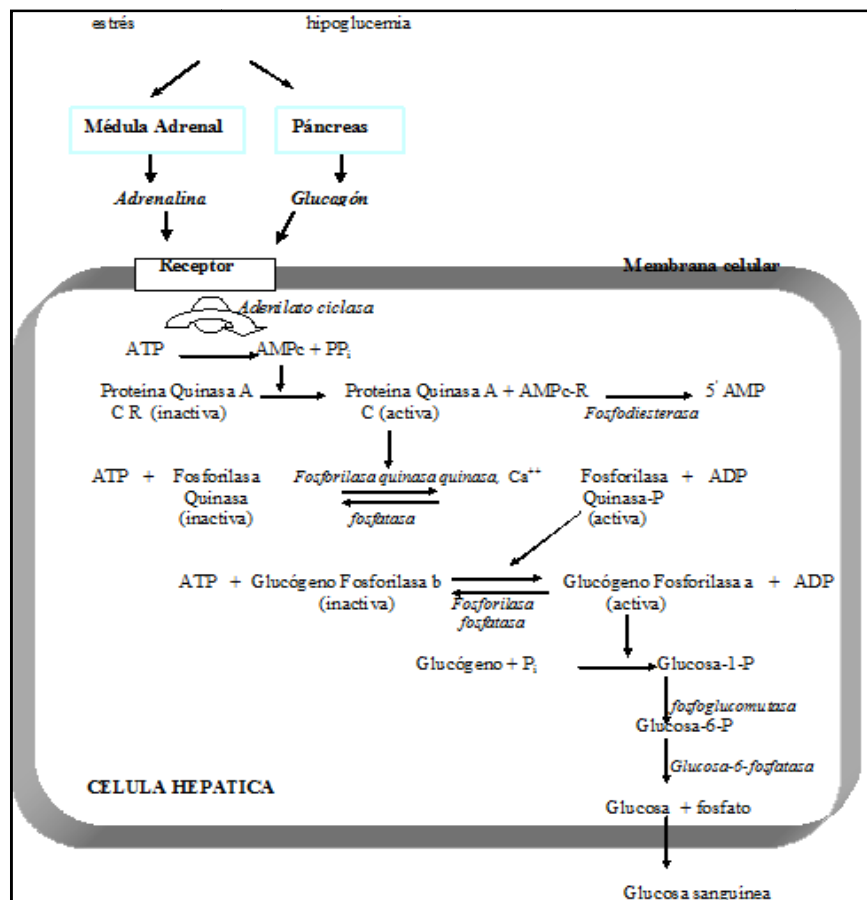


Fig. 4.9. Esquema de la regulación por modificación covalente de la glucógeno fosforilasa.

Metabolismo del almidón

El almidón es el polisacárido de reserva en muchos vegetales y es el principal hidrato de carbono en la alimentación humana. Al igual que el glucógeno, el almidón es un polímero de glucosa pero posee un menor porcentaje de ramificaciones que el glucógeno.

Durante el día las células de las hojas toman carbono que se convierte, mediante la fotosíntesis, en sacarosa y almidón. La sacarosa se exporta a los tejidos no fotosintéticos y el almidón se almacena.

a) Síntesis de almidón

La síntesis de almidón ocurre en los cloroplastos para su almacenamiento temporal como uno de los productos finales de la fotosíntesis, y en los amiloplastos de las partes no fotosintéticas de las plantas para su almacenamiento a largo plazo.

La síntesis usa como sustrato ADP-glucosa, que es transferido por almidón sintasa al extremo reductor moléculas de almidón preexistentes. Al igual que lo que ocurre en la síntesis de glucógeno, la formación de las ramificaciones de la molécula se lleva a cabo por la actividad de una enzima ramificante.

b) Degradación de almidón

En el ser humano, la degradación de almidón es llevada a cabo por la amilasa salival y la amilasa intestinal, endoenzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces glicosídicos α -1,4, liberando maltosa, maltotriosas y oligosacáridos solubles, pero que son incapaces de hidrolizar los enlaces α -1,6 de las ramificaciones, para lo cual se requiere de enzimas desramificantes.

Los glucanos solubles continúan siendo degradados por la acción de β -amilasas. Los productos de la acción de las amilasas son hidrolizados hasta glucosa libre por acción de enzimas del borde en cepillo intestinal.

PROBLEMAS A RESOLVER- CICLO DE KREBS

1) Señale la posición del carbono isotópico en el ácido cítrico, cuando se incuban los siguientes compuestos marcados isotópicamente:

a) $3\text{-}^{*}\text{C}$ –Piruvato

b) $2\text{-}^{*}\text{C}$ - Piruvato

2) ¿Cuál es el rendimiento en ATP cuando cada uno de los siguientes sustratos es oxidado completamente a CO_2 por un homogenato celular? Suponga que la glicólisis, el ciclo del ácido cítrico y la fosforilación oxidativa son completamente activos.

a) Piruvato.

b) Lactato.

c) Fructosa-1,6 difosfato.

d) Fosfoenolpiruvato.

e) Fosfato de dihidroxiacetona.

3) Los agentes quelantes o secuestrantes desempeñan un papel fundamental en la industria de los alimentos al reaccionar con los iones metálicos y alcalinotérreos para formar complejos que alteran las propiedades de los iones y sus efectos sobre los alimentos. Muchos de los agentes quelantes empleados en la industria alimentaria son sustancias naturales como los ácidos policarboxílicos: cítrico, málico, tartárico, oxálico y succínico.

La mayor parte del ácido cítrico utilizado en la industria alimentaria se obtiene por procesos biotecnológicos, utilizando cepas de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*.

Si se trabaja con un medio de cultivo cuya concentración de glucosa es 0,8 M, considerando que el 80 % de la misma es utilizada para la síntesis de ácido cítrico, calcule:

a) ¿Cuál sería el rendimiento teórico de ácido cítrico (M) obtenido en esas condiciones? Suponga que el oxalacetato proviene de otra fuente.

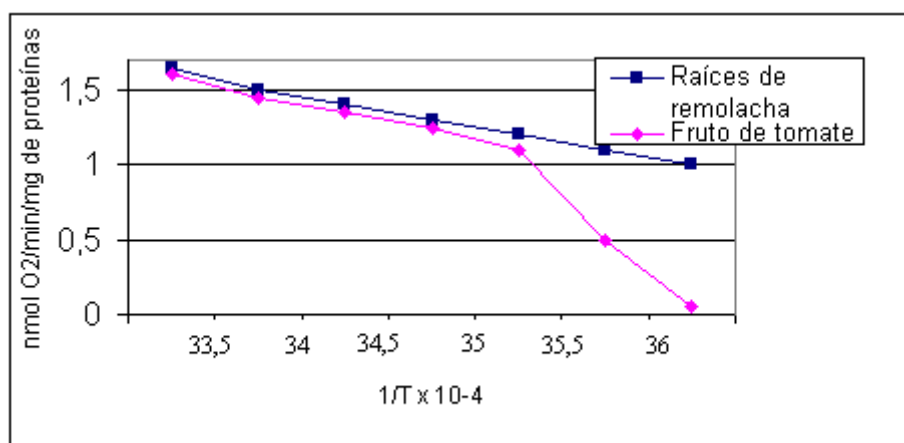
b) ¿Cuántos moles/l de ATP se producirían en la síntesis de ácido cítrico?

c) Los microorganismos gastan el 20 % restante de la glucosa en el mantenimiento y funcionamiento celular. Calcule la cantidad de ATP producida por esta fuente de carbono cuando se degrada totalmente a CO_2 y H_2O .

4) Una forma de almacenar frutas y verduras frescas es manteniéndolas a bajas temperaturas.

Sin embargo, las bajas temperaturas pueden provocar daños en estos alimentos al romper el equilibrio de los procesos metabólicos y alterando la integridad y permeabilidad de las membranas biológicas. En algunos casos existe una relación directa entre un cambio de fase de las membranas y la velocidad de reacción de una enzima ligada a ella.

En un estudio realizado con tomate y remolacha, se midió la influencia de la temperatura en la oxidación de succinato en mitocondrias, dando los resultados indicados en la gráfica.



- Formule la reacción enzimática que se ve afectada en condiciones de bajas temperaturas.
- ¿Por qué disminuye el consumo de oxígeno a medida que disminuye la temperatura?
- ¿Qué diferencia encuentra entre ambos productos vegetales respecto a su sensibilidad a bajas temperaturas?

PROBLEMAS A RESOLVER - VÍA DE LAS PENTOSAS FOSFATO

1) Fructosa y glucosa son sustratos para la hexoquinasa, mientras que glucosa-6-P es sustrato para la glucosa-6-P deshidrogenasa. En una muestra de miel, **fructosa** y **glucosa** fueron determinadas por la siguiente técnica: a 0,5 ml de una solución de 10 mg de miel en 200 ml de agua, se le agregó hexoquinasa, glucosa-6-P deshidrogenasa y 1 μ mol de Cl_2Mg , NADP oxidado y ATP, llevando la mezcla a un volumen final de 1 ml, utilizando un buffer adecuado. El cambio de absorbancia a 340 nm fue de 0,260.

En un experimento paralelo se repitió el ensayo agregando además la enzima *fosfogluco isomerasa* y se observó un incremento de absorbancia de 0,552.

- a) Formular las reacciones involucradas.
- b) Determinar la cantidad de glucosa y fructosa que se hallan presentes. Considerar que 1 μ mol de NADPH/ml da una absorbancia de 6,2 a 340 nm.

2) Explicar el destino metabólico de la glucosa-6-fosfato bajo cada una de las siguientes condiciones:

- a) Cuando las necesidades de NADPH son mayores que las de ribosa-5-fosfato.
- b) Cuando las necesidades de ribosa-5-fosfato son mayores que las de NADPH.

PROBLEMAS A RESOLVER – METABOLISMO DE POLISACÁRIDOS

1) Las carnes DFD (del inglés: dark, firm, dry) constituyen un gran problema de calidad en la industria cárnica. Estas carnes se definen por poseer un pH igual o superior a 6 después de las 12 a 48 h postmortem. Su apariencia oscura y seca en la superficie junto a su consistencia firme, afecta negativamente su apariencia y dificulta su comercialización, ya que el consumidor las asocia con carnes mal conservadas u obtenidas de animales viejos.

Actualmente se tienen muchos cuidados a las condiciones en las que se mantiene el animal en los momentos previos al sacrificio, ya que se ha observado que aquellos animales que han sido sometidos a estrés o a agotamiento físico tienen una gran tendencia a dar lugar a la obtención de carnes DFD.

- a) ¿Cuál es la justificación bioquímica para esta observación?
- b) Esquematice las vías metabólicas puestas en juego.
- c) ¿Cómo explica el efecto del estrés en la calidad de la carne?
- d) Teniendo en cuenta sus respuestas anteriores, proponga mejoras para evitar las pérdidas de calidad de la carne.

2) El sabor dulce del maíz recién cosechado es debido a la gran cantidad de azúcar de los granos (fructosa, glucosa, etc.). El maíz comprado en el mercado (varios días después de la cosecha) no es tan dulce debido a que el 50 % del azúcar libre del maíz se convierte en almidón durante el primer día después de la cosecha. Sobre la base de estos datos escriba o explique:

- a) La reacción de formación de almidón a partir de glucosa y fructosa.
- b) ¿De qué manera podría mantenerse el sabor dulce del maíz recién cosechado?

GUÍA DE ESTUDIO

Ciclo de Krebs

- ¿En qué lugar de las células se llevan a cabo las reacciones del ciclo de Krebs?
- Formular todas las reacciones del ciclo con nombre de las enzimas y coenzimas.
- En cada una de las reacciones de tipo redox ¿qué compuesto se oxida y cual se reduce?
- ¿Cuántos moles de ATP se produce por degradación de: acetil-CoA y piruvato?
- ¿Cuál es el aceptor de electrones en cada reacción de oxidación?
- ¿Cuáles son las enzimas que intervienen en la regulación del ciclo de Krebs?
- ¿Qué intermediarios del ciclo pueden servir como precursores de otras vías metabólicas?

Vía de las Pentosas:

- Reacciones, enzimas y cofactores. Formular.
- ¿Cuál es el mecanismo de acción de la transaldolasa y transcetolasa? ¿En qué reacciones actúan estas enzimas?
- ¿Cuáles son las enzimas de la parte oxidativa?
- ¿En qué reacciones se produce NADPH? ¿Qué vías metabólicas lo pueden utilizar?
- ¿Qué reacciones catalizan las enzimas epimerasa y isomerasa?
- ¿Cómo actúa el pirofosfato de tiamina?
- En la reacción de oxidación de glucosa-6-fosfato ¿Cuáles son los productos de reacción?
- ¿Qué intermediarios de la vía glicolítica se producen en esta vía?
- ¿En qué órganos y tejidos es más activa esta vía?

Glucogenólisis:

- ¿En qué tipo de unión y sobre qué extremo actúa la primera enzima que interviene en la degradación? ¿Cuáles son los productos de dicha reacción?
- ¿Cuáles son las enzimas que actúan sobre el glucógeno para degradarlo a glucosa-6-fosfato y dextrina límite?
- Un aumento de la concentración de glucagón en sangre: ¿qué acción tiene sobre la glucogenólisis a nivel del hepatocito?
- ¿Cómo se activa la degradación de glucógeno en el músculo?

Síntesis de glucógeno:

- ¿Qué enzimas participan en el proceso de síntesis?
- ¿Cómo se incorpora glucosa a la cadena?
- ¿En qué órgano se lleva a cabo?

Degradación de almidón:

- ¿En qué tipo de unión y sobre qué extremo actúa la primera enzima que interviene en la degradación? ¿Cuáles son los productos de dicha reacción?

Síntesis de almidón:

- ¿Qué enzimas participan en el proceso de síntesis?
- ¿Cómo se incorpora glucosa a la cadena?



BIBLIOGRAFÍA

- Blanco, A., “Química Biológica”, Ed. El Ateneo, 8^{va}. ed., Bs. As. (2006).Cap.11.
- Fennema, O., “Química de los Alimentos” 2^{da} ed. Acribia S.A. España (2000), Cap. 6.
- Lim, M.Y; ROACH, J. “Lo esencial en el metabolismo y nutrición”. Ed. Mosby. 3^o Edición. 2010.
- Nelson D., Cox M. “Lehninger. Principios de Bioquímica”, Ed. WH Freeman and Company, 5^{ta}. ed., Inglaterra (2008). Cap. 14-15.

TRABAJO PRÁCTICO N° 5

BIOSÍNTESIS Y DEGRADACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS – METABOLISMO DE COLESTEROL – CICLO DEL GLIOXILATO

OBJETIVOS

-  Comprender el metabolismo de lípidos, su interrelación con otras vías metabólicas y mecanismos de regulación.
-  Conocer la importancia del ciclo de glioxilato.

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Los lípidos de la dieta son una fuente importante de energía, aportando 9 kilocalorías por cada gramo degradado, más del doble que lo proporcionada por las proteínas y carbohidratos (4 kcal/gr). Por otro lado, las grasas, proporcionan sensación de saciedad y contribuyen a la palatabilidad de los alimentos. Además transportan vitaminas liposolubles: A, D, E y K.

Los lípidos de los alimentos pueden provenir de su fuente natural (leche, carnes, etc.) o ser un producto obtenido a partir de la misma (manteca, aceites, quesos, etc.)

Para que los lípidos de la dieta puedan ser utilizados por el organismo, deben ser digeridos y absorbidos en el tracto intestinal para luego ser distribuidos a través del torrente sanguíneo a las células de los distintos tejidos (principalmente hígado y tejido adiposo).

La mayor parte de los lípidos son transportados en la sangre, unidos a proteínas plasmáticas formando complejos denominados “lipoproteínas”. Los triglicéridos unidos a las lipoproteínas son hidrolizados a nivel del endotelio de los vasos sanguíneos a glicerol y ácidos grasos. El glicerol es transportado al hígado, y los ácidos grasos ingresan a las células donde serán almacenados, en forma de triglicéridos, o se degradarán para proveer de energía.

El colesterol, alcohol esteroide característico de los tejidos animales, desempeña una serie de funciones esenciales en el organismo y por lo tanto requiere de un aporte continuo.

METABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS

DEGRADACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

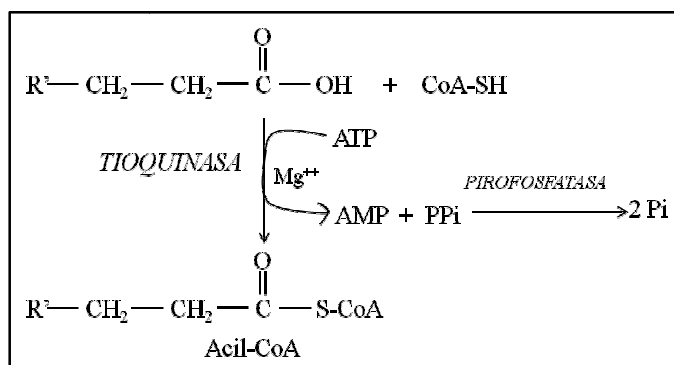
En mamíferos, el centro principal de acumulación de triglicéridos es el citoplasma de las células adiposas (adipocitos). El primer paso en la utilización de las grasas como fuente de energía es la hidrólisis de los triglicéridos por acción de lipasas reguladas por hormonas. Los productos de hidrólisis se liberan hacia la circulación sanguínea, donde los ácidos grasos son transportados unidos a la proteína plasmática



Luego los ácidos grasos libres se degradan en las mitocondrias de las células (hígado y tejidos extrahepáticos) por eliminación secuencial, a partir del extremo carboxílico, de unidades de dos carbonos (acetil-CoA), proceso conocido como vía de β -oxidación.

Previo a la β -oxidación, los ácidos grasos citosólicos deben ser activados y transportados conjugados con carnitina, a través de la membrana mitocondrial interna hasta la matriz mitocondrial donde se produce la oxidación.

La activación de los ácidos grasos ocurre en el citosol mediante la unión con coenzima A, reacción catalizada por la enzima *tioquinasa*. Se forma acil-CoA (forma “activada” del ácido graso) y se consumen en la reacción dos uniones ricas en energía.



El sistema de transporte de ácidos grasos activados comprende dos enzimas: la *carnitina acil transferasa I* y *II* (figura 5.1). El siguiente esquema nos permite comprender este sistema de transporte de ácidos grasos.

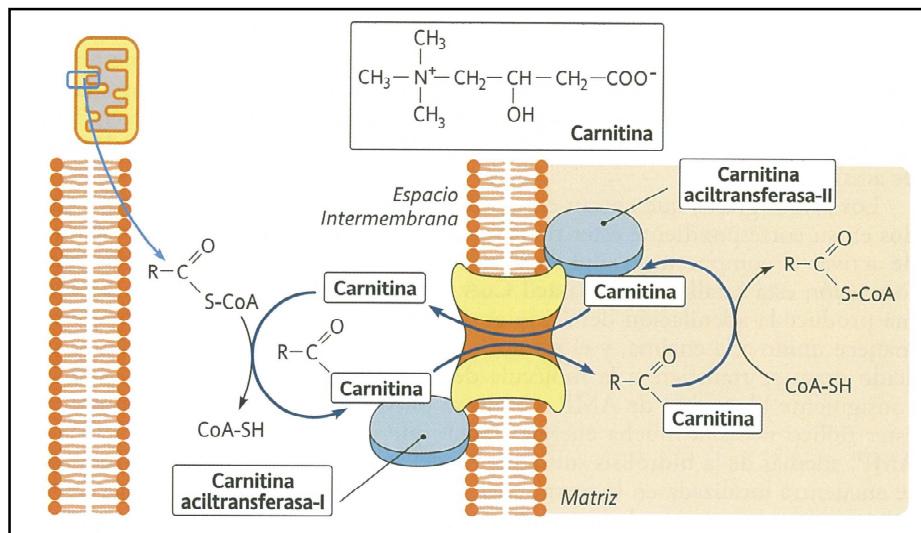


Fig 5.1. Representación esquemática del transporte de ácidos grasos hacia la matriz mitocondrial mediado por L-carnitina. Feduchi, Blasco, Romero, Yáñez, “Bioquímica. Conceptos esenciales”, 2015.

Las moléculas de acil-CoA dentro de la matriz mitocondrial sufren β -oxidación, una secuencia cíclica de cuatro reacciones: oxidación, hidratación, oxidación y ruptura de la cadena con liberación de acetil-CoA.

1-Primera oxidación: el acil-coenzima A sufre pérdida de dos hidrógenos de los carbonos α y β (2 y 3), esta deshidrogenación es catalizada por *acil-CoA deshidrogenasa*, enzima que utiliza FAD como aceptor de equivalentes de reducción.

2-Hidratación: esta reacción es catalizada por la enzima *enol hidratasa*, la cual adiciona H^+ y OH^- de una molécula de agua para saturar el doble enlace formado en la 1ª reacción.

3-Segunda oxidación: El β -hidroxiacil-CoA (producido en la reacción de hidratación) se deshidrogena en el carbono β en una reacción catalizada por una deshidrogenasa nicotinamídica la *β -hidroxiacil-CoA-deshidrogenasa*, siendo el aceptor de hidrógenos el NAD^+ .

4-Ruptura de la cadena y liberación de acetil-CoA: El β -ceto-acil-CoA, producto de la reacción de deshidrogenación, es escindido a nivel de la unión entre los carbonos α y β por acción de la enzima *tiolasa*. Esta reacción requiere otra molécula de coenzima A.

Los productos formados son acetil-CoA y un acil-CoA de dos carbonos menos que el inicial.

El ciclo de oxidación se repite sobre el acil-CoA hasta degradarlo completamente a acetatos activos. Los acetil-CoA generados en la degradación oxidativa de ácidos grasos ingresan al ciclo del ácido cítrico para su oxidación final a CO_2 y H_2O .

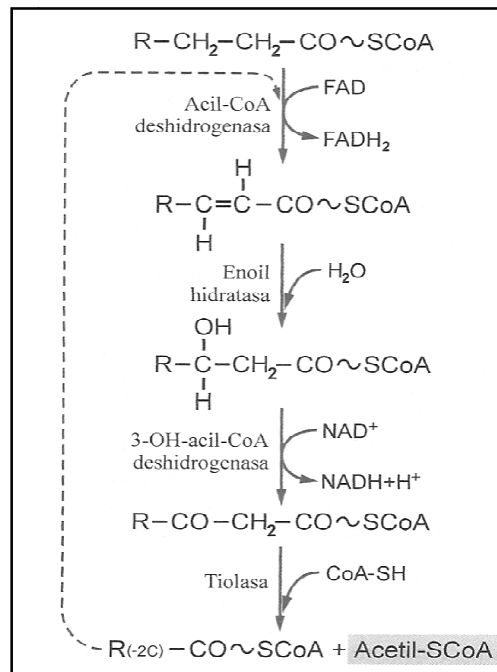


Fig 5.2. Etapas de la β -oxidación de un ácido graso. Blanco, A. “Química Biológica”. 2006.

Ácidos grasos y sabores

Durante su procesado y/o almacenamiento, los alimentos están sujetos a una serie de alteraciones que tienen una importante repercusión en la calidad de los mismos. Entre estas alteraciones, la oxidación lipídica ocupa un lugar primordial a causa de los cambios que produce en los alimentos, con consecuencias que implican modificaciones en su flavor, textura, consistencia y apariencia, así como en su valor nutritivo y seguridad.

Tanto las plantas como los animales poseen sistemas bioquímicos que transforman secuencialmente los glicerolípidos en derivados de los ácidos grasos a través de una serie de pasos.

Típicamente esta cascada se inicia con la maduración de los vegetales o tras un daño en los tejidos del alimento, lo cual origina la hidrólisis de los glicerolípidos por enzimas lipolíticas, seguida de una oxidación de los ácidos grasos liberados, por acción de lipooxigenasa, con formación de hidroperóxidos y, finalmente, una transformación enzimática de esos hidroperóxidos para formar una mezcla compleja de compuestos

(aldehídos, cetonas, lactonas) que dan origen a diversos sabores. Estas oxidaciones juegan un papel muy importante en el flavor característico de frutas y hortalizas. Por ejemplo, por hidroperoxidación del ácido linoleico, se obtienen aldehídos que aportan el flavor característico de los tomates y pepinos frescos. El desarrollo de aromas frutales agradables que acompaña a la maduración de peras, duraznos y otras frutas se asocia a la presencia de compuestos volátiles de cadena media (ésteres y lactonas), que derivan de la beta-oxidación de los ácidos grasos de cadena larga presentes en el fruto.

La oxidación de ácidos grasos también impacta en los sabores de las carnes de rumiantes y no rumiantes, por ejemplo en pollos la formación de aldehídos derivados de los ácidos araquidónico y linoleico, contribuye al flavor característico del pollo estofado.

Por otro lado, mediante la autooxidación no enzimática de lípidos se producen principalmente aldehídos y cetonas volátiles, que confieren a los alimentos sabores indeseables cuando sus concentraciones son suficientemente altas. Sin embargo estos mismos compuestos, en concentraciones más modestas, dan origen a sabores deseables en alimentos procesados y cocinados.

Cuando la oxidación ocurre mediante procesos autooxidativos, hay una producción azarosa de sabores porque la naturaleza de los compuestos volátiles originados es variable; por el contrario cuando la oxidación es de naturaleza enzimática se da origen a aromas singulares.

BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS

La síntesis de ácidos grasos se produce en el citosol y sus intermediarios están unidos a una proteína portadora de acilos (ACP). El sistema enzimático que cataliza la síntesis de ácidos grasos saturados de cadena larga, a partir de acetil-CoA, malonil-CoA y NADPH se denomina *ácido graso sintasa (AGS)*.

Como los ácidos grasos se sintetizan en el citosol a partir de acetil-CoA y ésta se genera principalmente en la matriz mitocondrial, es necesario transferirlo al citoplasma. La membrana interna de las mitocondrias no es permeable a acetil-CoA, por lo que el citrato atraviesa la membrana a través de un transportador y luego en citoplasma es escindido por acción de la enzima *citrato liasa*, en la cual participan coenzima A y ATP, se regeneran acetil-CoA y oxalacetato.

El acetil-CoA es utilizado para la síntesis de ácidos grasos y el oxalacetato sufre una serie de reacciones a través de las cuales se transforma malato o piruvato, que disponen

de transportadores en la membrana mitocondrial. El oxalacetato es reducido a malato por *malato deshidrogenasa* citosólica y luego descarboxilado a piruvato por la *enzima málica*, ligada a NADP.

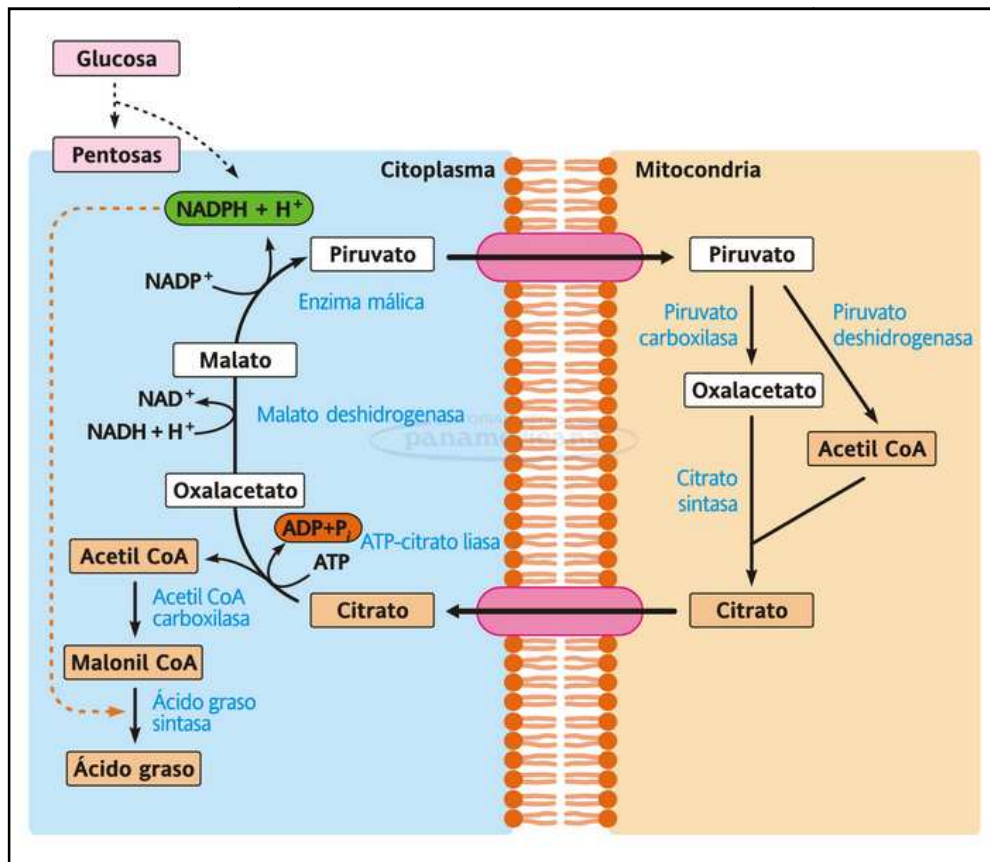
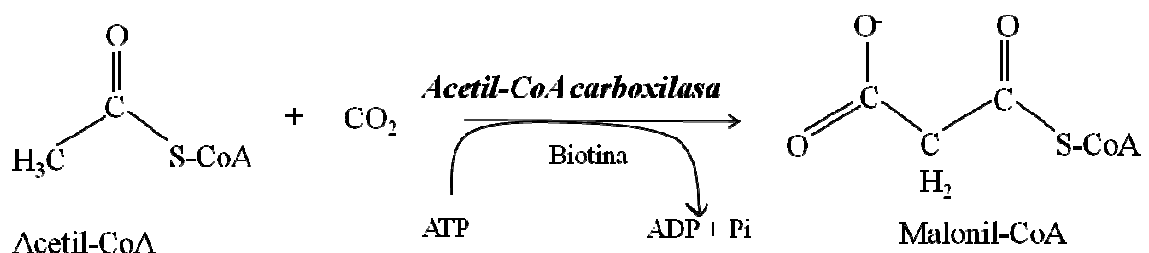


Fig 5.3. Transporte de restos acetilos hacia el citosol para la síntesis de ácidos grasos. Feduchi, Blasco, Romero, Yáñez. "Bioquímica. Conceptos esenciales". 2015.

Una vez que los restos acetilos se encuentran en el citoplasma ocurre la primera reacción de la síntesis de ácidos grasos que consiste en la generación de malonil-CoA. El malonil-CoA se sintetiza por carboxilación del acetil-CoA, reacción catalizada por la enzima *acetil-CoA-carboxilasa*, con biotina como coenzima. La reacción se acopla a la hidrólisis del ATP y es el principal sitio de regulación de la biosíntesis de ácidos grasos.



La *acetil-CoA carboxilasa* es regulada por fosforilación/desfosforilación (regulación covalente). La adición de fosfato, catalizada por *quinasas* dependientes de

glucagón, la inactivan. La activación es catalizada por *fosfatasa* estimulada por insulina. Además, la insulina induce la síntesis de *Acetil-CoA carboxilasa*. Esta enzima también es regulada alostéricamente, siendo activada por citrato, efecto revertido por la presencia de acil-CoA de cadena larga.

Luego de la síntesis de malonil-CoA ocurren una serie de reacciones representadas en la figura 5.4, que conducen a la formación de un ácido graso. En esta figura en particular se enumeran las reacciones que conducen a la síntesis de palmitato en los organismos superiores y bacterias.

El complejo *ácido graso sintasa*, compuesto por siete enzimas: *acetil transferasa*, *malonil transferasa*, *enzima condensante*, β -*cetoacil reductasa*, *3-hidroxiacil-deshidratasa*, *enoil reductasa*, *tioesterasa* y la proteína transportadora (PTA o ACP). Esta secuencia de reacciones forma butiril-ACP, lo cual completa el primer ciclo de elongación.

En el segundo ciclo el butiril es transferido desde la ACP a la enzima condensante (EC) formándose butiril-EC, éste se condensa con otra molécula de malonil-ACP y se repite el ciclo formando un hexil-ACP. Los ciclos de elongación continúan hasta llegar a palmitoil-ACP, el cual se hidroliza por una *tioesterasa* para producir palmitato y ACP.

Para sintetizar una molécula de Palmitato se requieren 7 moles de ATP utilizadas para la síntesis de 7 moléculas de malonil-CoA y 14 moléculas de NADPH utilizadas en las 2 etapas de reducción de cada uno de los 7 ciclos.

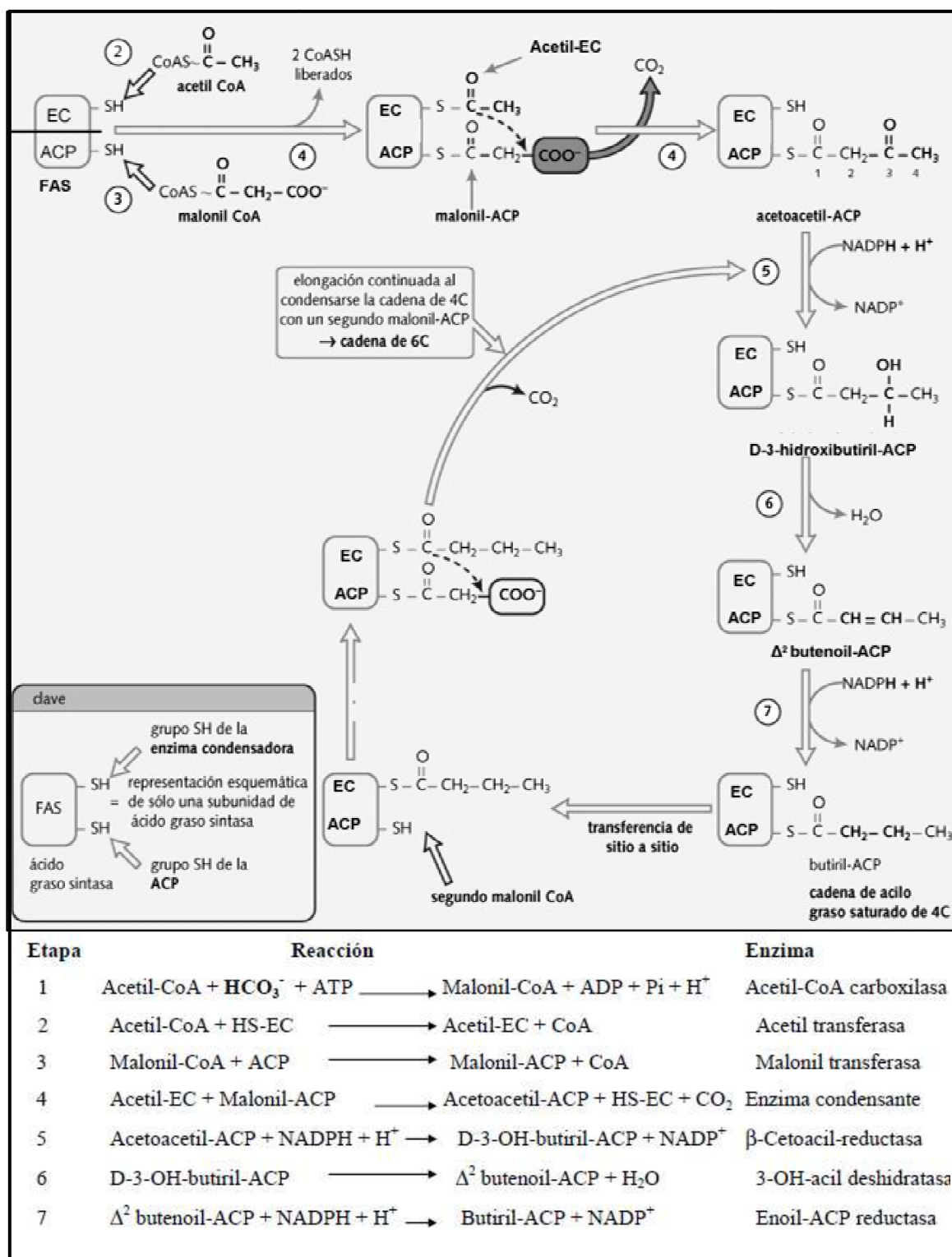


Fig 5.4. Reacciones involucradas en la biosíntesis de ácidos grasos. Modificado desde Benyon, S. "Metabolismo y Nutrición", 1998.

Comparación de la síntesis y degradación de los ácidos grasos

	Síntesis	Degradación
Activa	Tras comidas, situación posprandial	Ayuno y ejercicio prolongado
Principales tejidos implicados	Hígado y tejido adiposo	Músculo e hígado
Sitio celular	Citosol	Mitocondria
Donante/ productor de 2C	Acetil-CoA y Malonil-CoA	Acetil-CoA
Transportador de ácido graso activo	Unido a ACP	Unido a CoA
Enzimas	Ácido Graso Sintasa (complejo multienzimático)	Probablemente no asociadas.
Oxidante / reductor	NADPH	NAD ⁺ y FAD
Control alostérico	El citrato activa la acetil-CoA carboxilasa, el palmitoil-CoA la inhibe.	Malonil-CoA inhibe la carnitina-acil-transferasa I
Control hormonal	La insulina activa la acetil-CoA carboxilasa, la adrenalina y el glucagón la inhiben.	La adrenalina y el glucagón activan la lipasa, la insulina la inhibe
Producto	Palmitato.	Acetil CoA

METABOLISMO DEL COLESTEROL

El colesterol es un componente esencial de las membranas celulares, además es un precursor de hormonas esteroideas, ácidos biliares y de la vitamina D.

El colesterol ingresa en su reserva hepática a partir de la dieta o a través de síntesis endógena “de *novo*” por los tejidos extrahepáticos y por el propio hígado. En el hígado se convierte en sales biliares, que luego se secretan hacia la luz intestinal, o pasa a la bilis como colesterol sin modificar. También puede ser transportado por las lipoproteínas plasmáticas que lo envían hacia los tejidos periféricos.

El ser humano no puede degradar el colesterol por lo que la homeostasis se logra eliminándolo por vía biliar. Si se pierde el balance entre la ganancia y la pérdida de colesterol, éste se deposita de manera gradual en los tejidos, sobre todo en las cubiertas

endoteliales de los vasos sanguíneos. El hecho anterior puede convertirse en un riesgo potencial para la vida si el depósito de lípidos resulta en formación de placa, estrechamiento de la luz de los vasos sanguíneos (ateroesclerosis) y aumento del riesgo de enfermedad de arteria coronaria (EAC)

Síntesis de colesterol

Casi todos los tejidos del hombre sintetizan colesterol, aunque las mayores contribuciones a la reserva corporal de este lípido están a cargo del hígado, intestino, corteza suprarrenal y tejidos de la reproducción (como ovarios, testículos y placenta).

La síntesis de colesterol se divide en tres etapas:

1- Conversión de acetatos en mevalonato: dos moléculas de acetil CoA se condensan para formar acetoacetil-CoA (4C). La *HMG-CoA sintasa* cataliza la adición de una tercera molécula de acetil-CoA para formar HMG-CoA (6C). El HMG-CoA también es el intermediario en la síntesis de cuerpos cetónicos. Sin embargo, la formación de cuerpos cetónicos tiene lugar en la mitocondria, mientras que las reacciones de síntesis de colesterol ocurren en el citosol celular. Luego, en una reacción irreversible, limitante de la velocidad de la síntesis, el HMG-CoA es transformado en mevalonato. La enzima *HMG-CoA reductasa* requiere NADPH como agente reductor.

2- Transformación de mevalonato en escualeno

3- Conversión de escualeno en colesterol

Regulación de la síntesis de colesterol

La regulación en la producción de colesterol es necesaria para evitar la elevación de los niveles del colesterol plasmático, lo que podría conducir al depósito de colesterol en las paredes de las arterias y subsecuente formación de placas ateroscleróticas o ateromas.

-Regulación alostérica por colesterol: la HMG-CoA reductasa es inhibida por un incremento celular de colesterol y por los ácidos biliares.

-Regulación hormonal a corto plazo: glucagón inhibe por fosforilación a la *HMG-CoA reductasa*, disminuyendo la velocidad de síntesis del colesterol, por el contrario, la insulina induce la desfosforilación y activación de la enzima y un aumento de la síntesis de colesterol.

-Regulación a largo plazo de la HMG-CoA-reductasa: un nivel alto de colesterol en las células origina una disminución de la velocidad de transcripción del gen de la

HMG-CoA-reductasa, lo que produce una reducción secundaria de la síntesis de colesterol.

CICLO DEL GLIOXILATO

Los vertebrados no pueden utilizar los ácidos grasos o el acetato derivado de ellos como material de partida para sintetizar glucosa mediante gluconeogénesis. Sin embargo, en las plantas, ciertos invertebrados y algunos microorganismos, el acetato puede ser utilizado como fuente de fosfoenolpiruvato para la síntesis de glúcidos. En estos organismos las enzimas del ciclo del glioxilato catalizan la conversión neta de acetato en succinato u otro intermediario de cuatro átomos de carbono del ciclo de Krebs.

Al igual que ocurre en el ciclo de Krebs, en el ciclo del glioxilato el acetil-CoA se condensa con el oxalacetato para dar citrato que luego es convertido en isocitrato. Sin embargo, luego sobre el isocitrato actúa la *isocitrato liasa* formando succinato y glioxilato. El glioxilato se condensa con una segunda molécula de acetil-CoA para dar malato en una reacción catalizada por *malato sintasa*. Isocitrato liasa y malato sintasa son enzimas específicas del ciclo del glioxilato, las enzimas restantes son comunes a las enzimas del ciclo de Krebs.

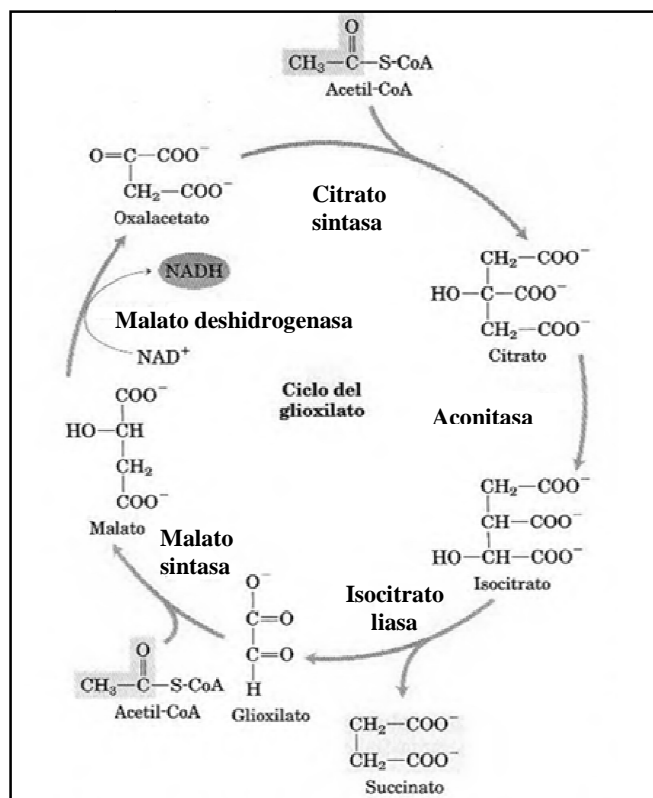


Fig. 5.5. Reacciones involucrados en el ciclo del glioxilato. Nelson, D.L. y Cox M.M., "Lehninger. Principios de Bioquímica", 2008.



Cada vuelta del ciclo del glioxilato consume dos moléculas de acetyl-CoA y produce una molécula de succinato, disponible para fines biosintéticos. El succinato puede convertirse a través de fumarato y malato en oxalacetato, el cual puede convertirse en fosfoenolpiruvato y producir glucosa mediante gluconeogénesis.

PROBLEMAS A RESOLVER**DEGRADACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS**

1) Se oxida palmitato ($9 -^{14}\text{C}$) en condiciones de funcionamiento del ciclo del ácido cítrico. ¿Cuál será la localización del ^{14}C en los siguientes compuestos?

- a) Acetil-CoA
- b) Citrato (considere tan solo una vuelta al Ciclo de Krebs)
- c) Butiril-CoA

2) ¿Cuántas veces se debe repetir la secuencia de oxidación de ácidos grasos para oxidar el ácido esteárico (18 C) completamente hasta acetil-CoA? ¿Cuántos ATP se generan?

3) Demostrar que el rendimiento de ATP por 6 carbonos de ácido graso es mayor que el de una hexosa. Considerar que el catabolismo procede hasta CO_2 y H_2O .

4) Suponga que tuviera que subsistir con una dieta consistente en grasa de ballena y foca, sin prácticamente ningún aporte de glúcidos.

- a) ¿Cuál sería el efecto de la privación de glúcidos sobre la utilización de grasas para la obtención de energía?
- b) Si la dieta no contiene glúcidos en absoluto, ¿sería mejor consumir ácidos grasos de cadena par o impar?

5) Investigue bibliográficamente la formación de compuestos volátiles derivados a partir de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga responsable del flavor y del *aroma agradable* durante la maduración de la fruta (tomates frescos, pepinos, peras, duraznos). Señale al menos dos vías diferentes.

6) El núcleo lipídico de los glóbulos grasos de la leche está constituido casi exclusivamente por triglicéridos, rodeados por una membrana plasmática a la cual están asociadas diversas enzimas (fosfatasa alcalina, xantina oxidasa, 5'nucleotidasa, fosfodiesterasas, etc).

Durante el proceso de homogenización de la leche a alta presión y velocidad, se reduce el tamaño de la partícula grasa desde 3-10 μm a menos de 2 μm , y es estabilizada por adsorción de proteínas (caseína).

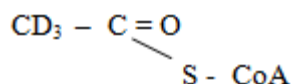
- a) ¿Puede influir el proceso de homogenización sobre la lipólisis y la oxidación de los lípidos inducida por el aire? Explique
- b) ¿Qué reacción enzimática ocurre en el glóbulo graso responsable de la lipólisis de los triglicéridos?
- c) ¿Cómo podría solucionar el problema planteado en el ítem a)?

BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS – METABOLISMO DE COLESTEROL - CICLO DEL GLIOXILATO

1) Suponiendo que se incubaba homogenato de tejido que posee todas las enzimas necesarias para la síntesis de ácidos grasos y también NADPH, ATP, CO_3H^- y $2\text{-}^{14}\text{C}$ – piruvato ¿Cuáles serán los átomos de carbono que resultarán marcados en el ácido palmítico?

2) Considere una preparación que contiene todas las enzimas y los cofactores necesarios para la biosíntesis de los ácidos grasos a partir de acetil-CoA y malonil-CoA.

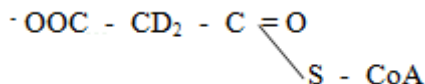
a) Si se añaden como sustrato acetil-CoA marcado con deuterio (D, isótopo pesado del hidrógeno) y un exceso de malonil-CoA:



a.1) ¿Cuántos átomos de deuterio se incorporarán a cada molécula de palmitato?

a.2) ¿Dónde quedarán localizados los átomos de deuterio? Explicar.

b) Si se añaden como sustratos acetil-CoA sin marcar y malonil-CoA marcada con deuterio



b.1) ¿Cuántos átomos de deuterio se incorporarán a cada molécula de palmitato?

b.2) ¿Cuáles serán sus localizaciones? Explicar.

3) ¿Cuál de los siguientes compuestos sirve para la síntesis neta de ácidos grasos, y cuántos átomos de carbono de cada uno de ellos puede ser convertido en carbono de ácido graso?

- | | |
|-------------|-------------------------|
| a) Fructosa | b) Bicarbonato de sodio |
| c) Sacarosa | d) Alanina |

4) Numerosos estudios epidemiológicos han demostrado que el alto consumo de colesterol y ácidos grasos saturados está íntimamente relacionado con la incidencia de aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares. Una de las herramientas más efectivas para reducir el riesgo de padecer estas enfermedades ha sido el cambio en los hábitos alimentarios, tendiendo a reducir el consumo de alimentos ricos en colesterol e incorporar en la dieta ácidos grasos mono y poliinsaturados.

Tanto la leche como sus derivados son componentes importantes de la alimentación humana. Proveen de calcio, fosfato, aminoácidos, vitaminas, carbohidratos y otros compuestos en forma y cantidades adecuadas para la nutrición. Sin embargo, estos productos son ricos en colesterol y pobres en contenido de ácidos grasos poliinsaturados, lo que constituye una importante desventaja.

La industria láctea ha desarrollado varias tecnologías con el objetivo de reducir el colesterol en sus productos. Ejemplos de ello son la extracción de los lípidos con solvente y también el cultivo de la leche con el ciliado *Tetrahymena thermophila*. Este microorganismo es un protozoario de vida libre, no patógeno, capaz de bioconvertir colesterol a D7-dehidrocolesterol (provitamina D3) y D7,22-dehidrocolesterol (un análogo de la provitamina D2) y que además posee la habilidad de convertir los ácidos grasos saturados a mono y poliinsaturados

a – Teniendo en cuenta lo descripto, mencione posibles ventajas y desventajas para cada metodología mencionada.

b- La leche es un alimento de naturaleza acuosa, ¿cómo se encuentra distribuido el colesterol, de naturaleza hidrofóbica, en este alimento?

c- De acuerdo a lo respondido en b, ¿qué otras enzimas serían necesarias para que *Tetrahymena thermophila* sea capaz de bioconvertir colesterol y ácidos grasos saturados?

d- En la mayoría de las personas hipercolesterolémicas, el consumo de alimentos libres o con bajo contenido de colesterol, no es suficiente para revertir completamente su desequilibrio. ¿Cómo podría explicar esto?

- 5) Los animales vertebrados son incapaces de sintetizar carbohidratos a partir de acetil-CoA, mientras que las semillas de plantas oleaginosas en germinación sí lo hacen, siendo ésta la única vía de obtención de glucosa.
- a) ¿Cuál es la explicación de este fenómeno?
- b) ¿Qué enzimas específicas se requieren para conseguir la síntesis neta del oxalacetato a partir de acetil-CoA?
- c) Formule la reacción equilibrada.

GUIA DE ESTUDIO

Degradación de ácidos grasos

- Formular la primera secuencia de reacciones de la degradación de palmitoil-CoA, mencionando las enzimas que intervienen.
- ¿Qué enzima interviene en el proceso de activación de un ácido graso? Formular la reacción. ¿Cuántas uniones de alta energía se gastan?
- ¿Cómo se transporta el ácido graso desde el citosol a la mitocondria?
- ¿Cuáles son las coenzimas que intervienen en el proceso de β -oxidación?
- ¿En qué lugar de la célula ocurre el proceso de degradación de los ácidos grasos?
- ¿Cuáles son los productos de la degradación de un ácido graso de número impar de átomos de carbono?
- ¿Cuántos ATP y cuántas moléculas de acetil-CoA se producen por degradación de un ácido graso de 12 átomos de carbono hasta acetil-CoA? Idem hasta CO_2 y H_2O .
- ¿En qué procesos metabólicos pueden utilizarse los carbonos provenientes de la degradación de los ácidos grasos?

Biosíntesis de Ácidos Grasos

- Formular las etapas de la síntesis de ácidos grasos indicando las enzimas correspondientes.
- ¿Cuál es el intermediario del Ciclo de Krebs que transporta los grupos acetatos desde la mitocondria al citosol?
- ¿Cuál es la etapa limitante de la velocidad de reacción y cuáles son los moduladores de la enzima?
- ¿Cuáles son los precursores de la síntesis de ácidos grasos?
- ¿Cuántas moléculas de NADPH y ATP se requieren para sintetizar palmitoil-ACP?
- ¿De dónde proviene el NADPH?

Metabolismo de colesterol

- ¿Cuál es el sustrato de la síntesis?
- Etapa limitante de la biosíntesis. Enzima reguladora.
- Regulación de la síntesis.
- ¿Cómo se elimina el colesterol?

Ciclo del Glioxilato

- ¿En qué organismos ocurre?
- ¿Cuáles son las enzimas implicadas?
- ¿Qué ventajas adaptativas aporta el funcionamiento de este ciclo?

BIBLIOGRAFÍA

- Blanco, A., “Química Biológica”, Ed. El Ateneo, 8^{va}. ed., Bs. As. (2006).Cap.12.
- Feduchi, E., Blasco, I., Romero, C.S. y Yáñez, E. “Bioquímica. Conceptos esenciales”, Ed. Médica Panamericana, Bs. As. (2015).
- Fennema, O., “Química de los Alimentos” 2^{da} ed. Acribia S.A. España (2000), Cap. 6.
- Lim, M.Y; ROACH, J. “Lo esencial en el metabolismo y nutrición”. Ed. Mosby. 3^o Edición. 2010.
- Nelson D., Cox M. “Lehninger. Principios de Bioquímica”, Ed. WH Freeman and Company, 5^{ta}. ed., Inglaterra (2008).Cap. 16-20.

TRABAJO PRÁCTICO N°6

DEGRADACIÓN DE AMINOÁCIDOS

OBJETIVOS

- Comprender el metabolismo de aminoácidos, su interrelación con otras vías metabólicas y mecanismos de regulación.

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

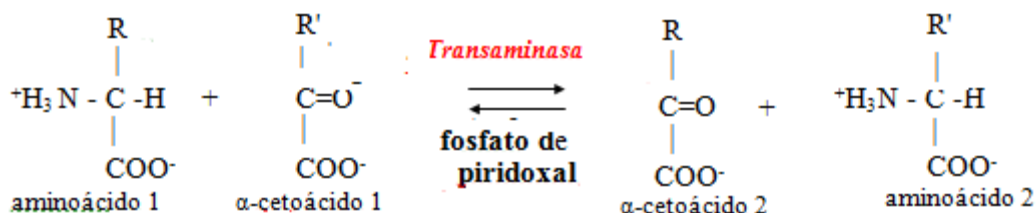
La función fundamental de las proteínas en la dieta es la de proporcionar nitrógeno aminoacídico para la síntesis de nuevas proteínas y otras sustancias nitrogenadas. Las proteínas de los alimentos deben ser digeridas, por enzimas proteolíticas del tracto intestinal, a péptidos pequeños o aminoácidos libres.

Las enzimas proteolíticas incluyen: la *pepsina* presente en el jugo gástrico, proteasas segregadas por el páncreas (*tripsina*, *quimotripsina*, *carboxipeptidasas A y B*, *elastasa*) y por las células de la mucosa intestinal (*aminopeptidasas*, *dipeptidasas*).

Los aminoácidos libres y los péptidos pequeños se absorben a través de las células de la mucosa intestinal. Existen mecanismos específicos de absorción para aminoácidos ácidos, básicos y neutros. Los péptidos absorbidos son hidrolizados a aminoácidos en el interior de la célula intestinal, los cuales pasan luego a la vena porta para su transporte principalmente al hígado u otros tejidos.

Además de su rol primario en la síntesis de proteínas tisulares, los aminoácidos pueden ser convertidos en otros metabolitos esenciales o ser degradados a sus esqueletos carbonados tras la eliminación del grupo amino. Los restos carbonados pueden convertirse en otros metabolitos (glucosa, cuerpos cetónicos, etc.) u oxidarse mediante el Ciclo de Krebs, para producir CO_2 , H_2O y ATP. La pérdida del grupo amino ocurre por dos rutas principales: transaminación y desaminación oxidativa.

La ecuación general de transaminación puede representarse así:



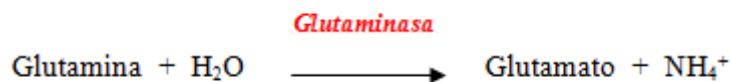
Uno de los α -cetoácidos implicados con mayor frecuencia en las reacciones de transaminación es el α -cetoglutarato. Cuando éste recibe el grupo amino cedido por

[illegible]

aspartato α-cetoglutarato oxalacetato glutamato

$$\begin{array}{ccc}
 \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ | \\ \text{COO}^- \end{array} & + \text{H}_2\text{O} + \text{NAD}^+ & \xrightleftharpoons[\begin{array}{c} (+)\text{ADP, GDP} \\ (-)\text{ATP, GTP} \end{array}]{\begin{array}{c} \text{Glutamato} \\ \text{Desidrogenasa} \end{array}} \\
 \text{L-Glutamato} & & \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{C=O} \\ | \\ \text{COO}^- \end{array} + \text{NH}_4^+ + \text{NADH} + \text{H}^+ \\
 & & \alpha\text{-cetoglutarato}
 \end{array}$$
$$\text{ATP} + \text{NH}_4^+ + \text{glutamato} \xrightarrow[\text{Mg}^{++}]{\text{Glutamina sintetasa}} \text{ADP} + \text{Pi} + \text{glutamina} + \text{H}^+$$

En la mayor parte de los animales, la glutamina es transportada por vía sanguínea hasta el hígado en donde se transforma en glutamato y amoníaco por acción de la **glutaminasa**. Esta enzima también se encuentra en los túbulos renales.



En la mayoría de los vertebrados terrestres, el NH_4^+ así formado se convierte en urea, en el hígado, y en menor proporción en riñón, y luego ésta es excretada con la orina.

Ciclo de la urea

Los átomos de nitrógeno de los grupos alfa amino, separados de los aminoácidos por degradación oxidativa, son excretados por orina en forma de urea, amoníaco o ácido úrico, según la especie.

La formación de urea tiene lugar en el hígado y es catalizada por una secuencia de reacciones enzimáticas que se denomina ciclo de la urea. Utiliza el amoníaco de las reacciones de desaminación oxidativa y CO_2 , incorporándose luego otro resto amino proveniente del aspartato.

La urea es transportada por la sangre a los riñones y se elimina por orina.

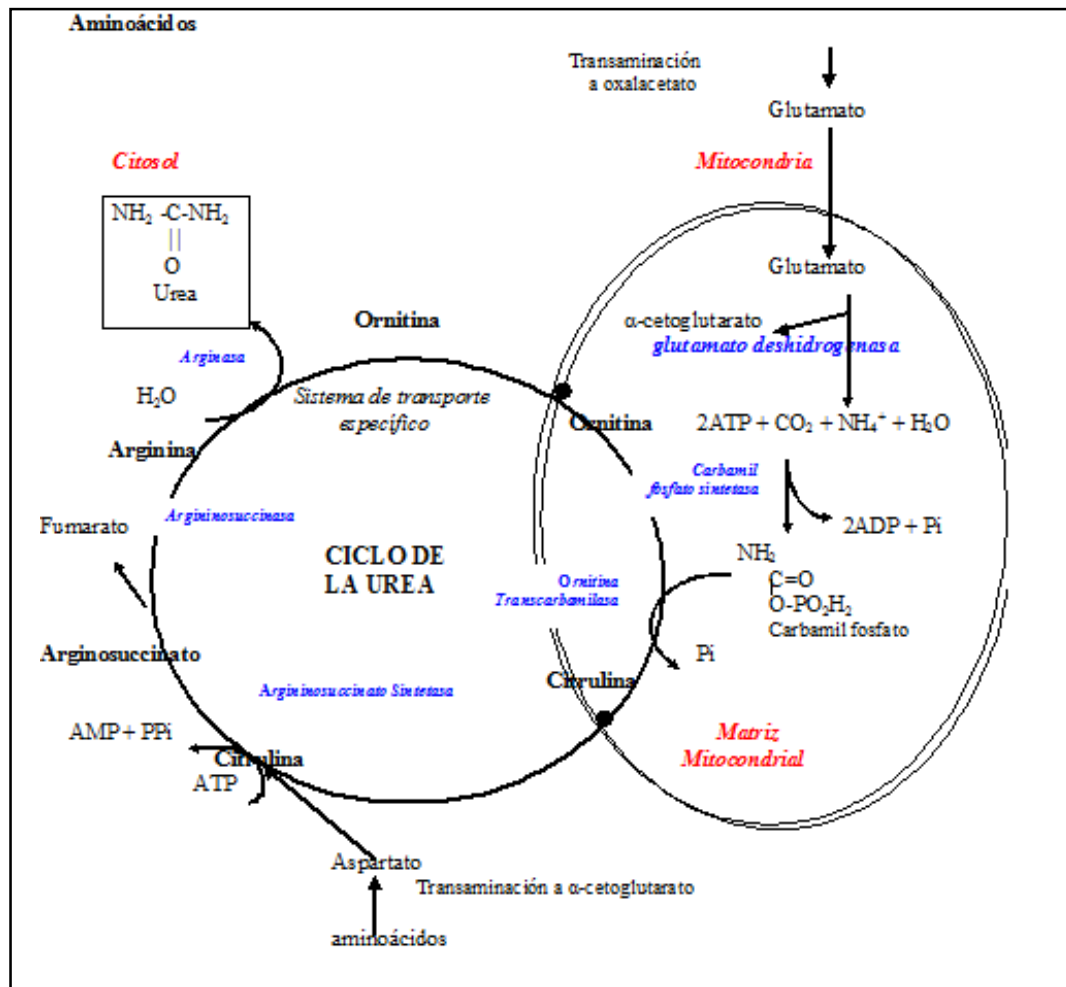


Fig. 6.1. Esquema de las reacciones involucradas en el ciclo de Krebs.

Destino del esqueleto carbonado de los aminoácidos

Para la degradación existen secuencias multienzimáticas que convergen finalmente en unas pocas rutas terminales que conducen al piruvato, a acetil-CoA o a los intermediarios del ciclo de Krebs, como lo muestra el esquema siguiente:

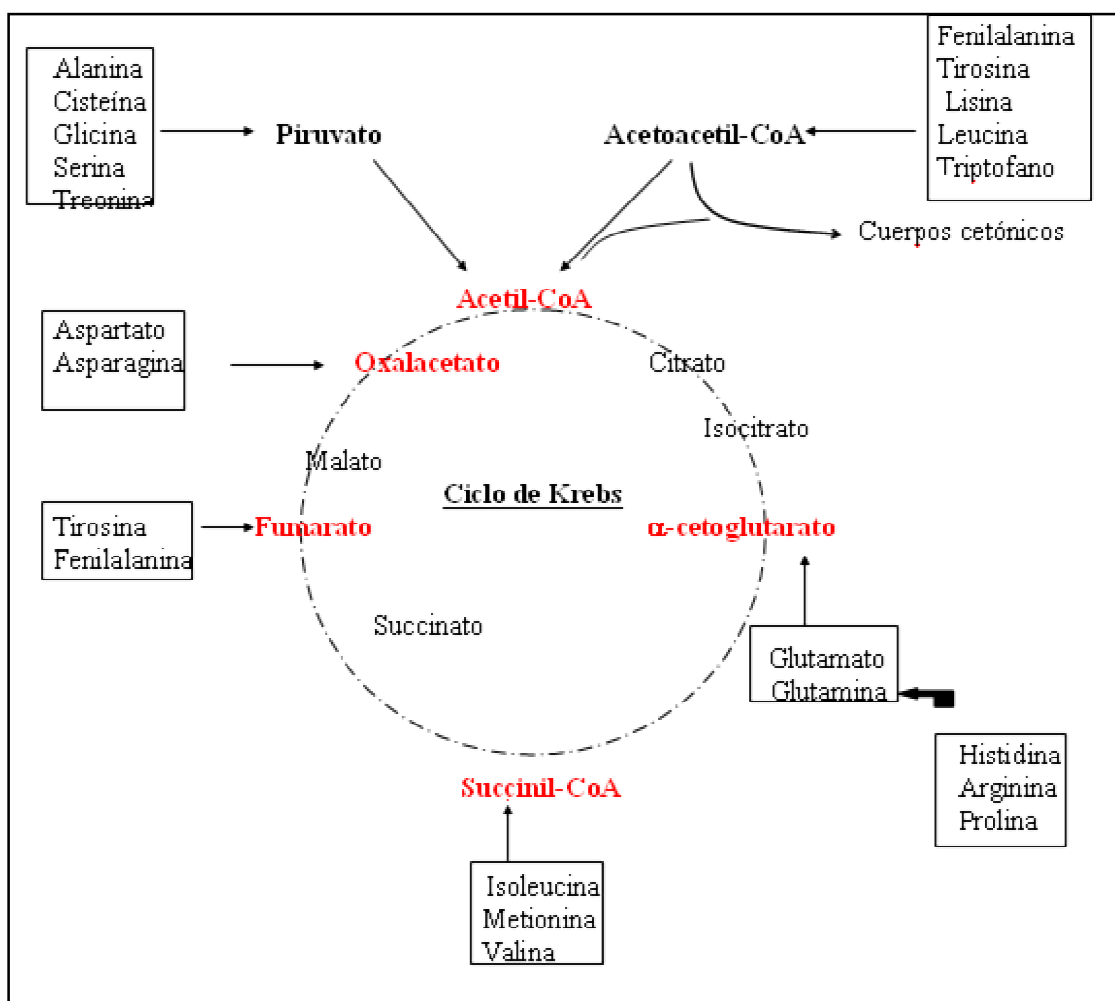
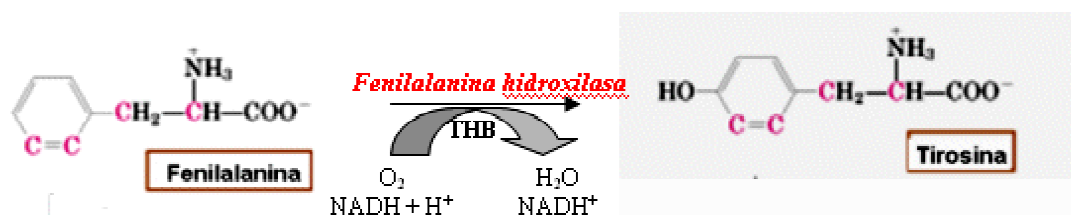


Fig. 6.2. Destino de los esqueletos carbonados de los aminoácidos.

Catabolismo de aminoácidos aromáticos: fenilalanina y tirosina

En condiciones normales, la fenilalanina se convierte en tirosina mediante una reacción irreversible catalizada por fenilalanina hidroxilasa.



THB: tetrahidrobiopterina

En la enfermedad hereditaria denominada fenilcetonuria, existe un déficit de la enzima fenilalanina hidroxilasa. En esta situación, fenilalanina se acumula y transamina, formando el cetoácido fenil-piruvato. Este compuesto origina luego fenil-acetato y fenil-lactato, los cuales son excretados en grandes cantidades por los pacientes que

padecen esta patología. En nuestro país es obligatorio el diagnóstico de esta deficiencia enzimática en todos los recién nacidos (Ley 26.279), ya que la falta de un tratamiento adecuado y a tiempo, conduce a retraso mental.

Funciones precursoras de los aminoácidos: conversión a productos especializados

La síntesis proteica es la función sintética principal de los aminoácidos, desde un punto de vista cuantitativo, pero además sirven como precursores de otros compuestos nitrogenados. Los compuestos, derivados de aminoácidos, fisiológicamente muy importantes, constituyen los llamados péptidos bioactivos, que incluyen al hem, purinas, pirimidinas, hormonas, neurotransmisores. Estos compuestos tienen gran importancia médica o farmacológica. Por ejemplo a partir del **ácido glutámico**, por descarboxilación, se forma el ácido γ -aminobutírico (GABA). La enzima que cataliza esta reacción se encuentra preferentemente en la sustancia gris del sistema nervioso central. El GABA es un intermediario químico regulador de la actividad neuronal. Actúa como inhibidor de la transmisión del impulso nervioso. Su deficiencia provoca cuadros de epilepsia.

Fenilalanina y tirosina pueden seguir una vía metabólica que conduce a la síntesis de sustancias de gran actividad fisiológica llegando a la formación de catecolaminas, adrenalina, noradrenalina y dopamina.

PROBLEMAS A RESOLVER

1) Las semillas de leguminosas (soja, maní, habas, guisantes) y sus harinas, son utilizadas en alimentos y piensos. Estas contienen proteínas que se fijan e inhiben a enzimas proteolíticas *in vivo*, reduciendo la digestión y el valor nutritivo de las proteínas que se ingieren.

En las semillas de soja se encuentran inhibidores de tripsina e inhibidores de quimotripsina termolábiles, capaces de inhibir efectivamente las proteasas de distintas especies animales, y se caracterizan por poseer proteínas con un bajo contenido en cisteína y metionina.

- a) ¿Cuáles podrían ser los riesgos de una dieta con un 80% de aporte proteico como harina de soja?
- b) ¿Qué reacciones metabólicas se afectan en intestino cuando se ingieren estas proteínas?
- c) Sugiera un tratamiento a estos alimentos para evitar los efectos negativos de a) y b).

2) Nombrar los α -cetoácidos que se forman por transaminación de los siguientes aminoácidos:

- a) Alanina
- b) Aspartato
- c) Glutamato
- d) Fenilalanina
- e) Tirosina

3) Existe una enfermedad hereditaria en el hombre, que causa severo retraso mental, llamada fenilcetonuria. La misma se debe a la deficiencia de la enzima fenilalanina hidroxilasa, y se caracteriza por la excreción urinaria de fenilpiruvato, fenilacetato y fenil-lactato. La industria alimentaria se ocupa del diseño de alimentos destinados a estos enfermos.

- a) Formule la reacción catalizada por la enzima deficitaria.
- b) Escriba la reacción que conduce a la formación de fenilpiruvato como vía secundaria
- c) ¿Qué cuidados tendría al diseñar un alimento destinado a fenilcetonúricos?
- d) ¿Utilizaría una proteína vegetal pobre en aminoácidos aromáticos?
- e) Busque en el mercado alimentos no aptos para ser consumidos por fenilcetonúricos y observe su composición.

4) La Vitamina B₆ en sus formas: piridoxal, piridoxina y piridoxamina, como fosfatos, está ampliamente distribuida en los reinos vegetal y animal. Su forma más estable es el piridoxal que se utiliza para fortificar alimentos debido a las pérdidas ocasionadas durante diferentes tratamientos tecnológicos (enlatado, congelación, pasteurización, esterilización, etc). Esta vitamina es indispensable como cofactor en reacciones del metabolismo de aminoácidos, tales como:

- a) Desaminación.
- b) Descarboxilación.

Ejemplifique con los aminoácidos tirosina y serina, esquematizando las reacciones correspondientes.

5) Los tres carbonos del lactato y de la alanina poseen estados de oxidación idénticos y los animales pueden emplear cualquiera de ellos como fuente carbonada para combustible metabólico. Compárese el rendimiento neto en ATP (moles de ATP por mol de sustrato) para la oxidación completa a CO₂ y H₂O, del lactato frente a la alanina cuando se incluye la excreción de nitrógeno en forma de urea.

6) Dos grupos de ratas fueron alimentados con ¹⁵N-aspartato. Un grupo fue también alimentado con fluoracetato (el cual es convertido en fluorocitrato, que es un inhibidor de la aconitasa).

Después de tres días, los animales fueron sacrificados, las proteínas hepáticas hidrolizadas, y el glutamato se determinó por la presencia del ¹⁵N. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Glutamato aislado % de ¹⁵ N	Grupo con ¹⁵ N-aspartato	Grupo con ¹⁵ N-aspartato y fluoracetato
	0,65	0,12

Explicar la disminución de la incorporación de ¹⁵N en el glutamato del segundo grupo.

GUÍA DE ESTUDIO

Digestión de proteínas

- ¿Qué órganos participan en la digestión de proteínas?
- Zimógenos: órganos que los producen, mecanismos de activación, acción enzimática.
- Absorción intestinal de aminoácidos.

Degradación de aminoácidos

- Formule las dos reacciones mediante las cuales los aminoácidos pierden su grupo amino.
- ¿En qué lugar de la célula se encuentran estas enzimas?
- ¿Cuáles son los inhibidores y activadores alostéricos de la enzima glutamato deshidrogenasa?
- Formule las reacciones de transaminación de GOT Y GPT.
- ¿Cuáles son los aminoácidos glucogénicos y cetogénicos?
- ¿Cómo se sintetiza glutamina? Formule la reacción completa.
- ¿Mediante qué reacciones la glutamina se transforma en un intermediario del ciclo de Krebs?
- ¿Cómo explica la toxicidad del ión amonio en el SNC?
- ¿Cuál es el cofactor que utilizan las transaminasas y cómo actúa?
- Esquematice la reacción de fenilalanina a tirosina indicando enzima y cofactor.
- ¿Cuáles son los productos de degradación de treonina, serina, glicina y cisteína?
- ¿Cuál es el cofactor de las reacciones de desaminación no oxidativa? Ejemplos.
- ¿En qué vías metabólicas pueden utilizarse los productos de degradación de los aminoácidos?
- ¿Qué intermediarios del ciclo de Krebs se forman por degradación de cada uno de los aminoácidos?

Ciclo de la urea

- ¿En qué órganos se lleva a cabo el ciclo de la urea?
- ¿En qué lugar de la célula ocurren las diferentes reacciones del ciclo y qué funciones cumple?
- ¿Cuáles son las dos reacciones que permiten la eliminación del grupo amino de los aminoácidos y su entrada al ciclo de la urea como ión amonio?
- ¿De cuáles aminoácidos provienen los nitrógenos de la urea?

- ¿De qué reacción proviene el primer grupo amino que entra en el ciclo de la urea en forma de amoníaco libre?
- Esquematice la reacción completa de formación del fosfato de carbamilo y su posterior reacción con ornitina.
- Formule la reacción completa de formación de argininosuccinato.
- ¿Qué enzima interviene en la formación de urea a partir de arginina y cuáles son los productos de la reacción?
- ¿Cuáles son las reacciones que consumen energía y cuántos enlaces ricos en energía se gastan en cada una de ellas?
- ¿Qué productos de desecho se eliminan por el ciclo de la urea?

BIBLIOGRAFÍA

- Nelson D., Cox M. “Lehninger. Principios de Bioquímica”, Ed. WH Freeman, 5^{ta}. ed., Inglaterra (2008).Cap. 17 y 21.
- Fennema, O., “Química de los Alimentos”. 2^{da} ed. Acribia S.A. España (2000), Cap. 6.

TRABAJO PRÁCTICO N° 7

METABOLISMO DE NUCLEÓTIDOS

OBJETIVOS

- ✚ Comprender el metabolismo de nucleótidos, su interrelación con otras vías metabólicas y mecanismos de regulación.

INTRODUCCIÓN

La biosíntesis de los desoxirribonucleótidos y de los ribonucleótidos, constituye un proceso fundamental en todas las células, puesto que los nucleótidos son los precursores directos del DNA y del RNA, y además muchos participan en el metabolismo como coenzimas.

Un aspecto importante de la biosíntesis de los nucleótidos lo constituye la ruta de formación de sus bases: las pirimidinas y las purinas.

Tanto los nucleótidos como sus bases nitrogenadas se emplean con economía, en la mayoría de los organismos no se utilizan como fuente de energía.

Los ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos son sintetizados a partir de compuestos sencillos y en la mayor parte de los organismos siguen la misma vía (solamente algunas bacterias requieren bases púricas o pirimidínicas preformadas).

Estas vías de biosíntesis de los nucleótidos están sometidas a estrictos mecanismos de control a través de enzimas alostéricas. Dado que los cuatro desoxirribonucleótidos principales y los cuatro ribonucleótidos fundamentales se hallan insertados en el DNA y en el RNA de las células según relaciones molares específicas, dichos mecanismos reguladores se adecuan para lograr una proporción de nucleótidos conveniente para cada tipo de ácido nucleico y para cada tipo de célula.

Tanto el DNA como el RNA son polinucleótidos constituidos cada uno por:

- una base nitrogenada
- un grupo fosfato
- una pentosa

En el DNA la pentosa es la 2-D-desoxirribosa, las bases nitrogenadas derivadas de la purina son adenina y guanina y las derivadas de la pirimidina son timina y citosina.

En el RNA la pentosa es la D-ribosa, las bases nitrogenadas derivadas de la purina son adenina y guanina y las derivadas de la pirimidina son uracilo y citosina.

Biosíntesis de ribonucleótidos púricos

Se ha podido determinar el origen de cada uno de los carbonos y nitrógenos del núcleo de las purinas:

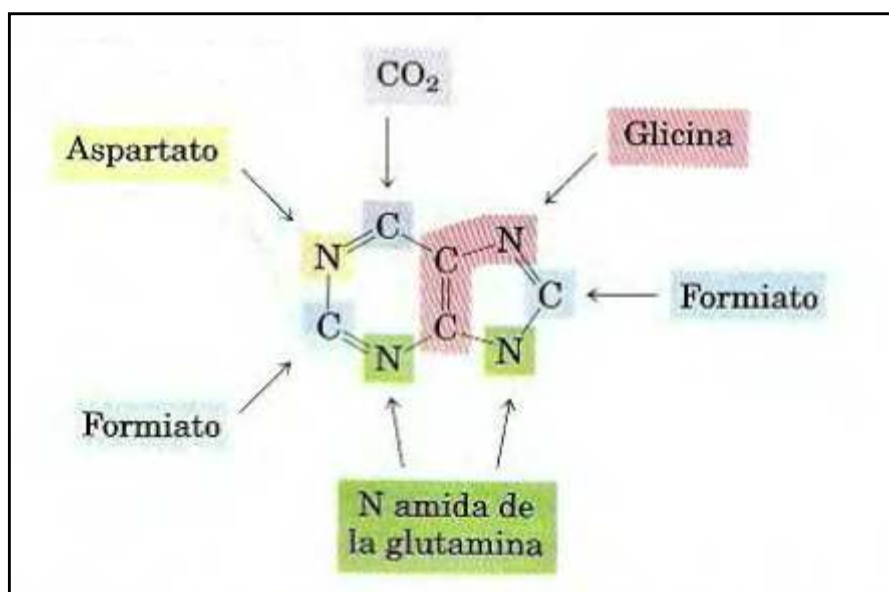
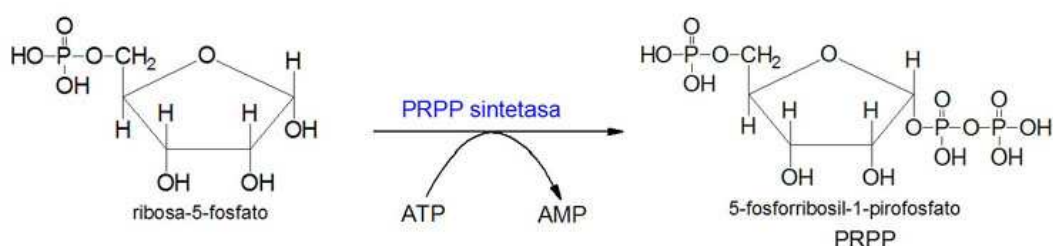


Fig. 7.1. Origen de los átomos de carbono y nitrógeno que constituyen el anillo de purina. Tomado de Nelson D.L. and Cox M.M., "Lehninger. Principios de Bioquímica", 2008.

Aunque podría esperarse que se sintetizase el anillo de purina en primer lugar y se uniese después la porción de fosfato de ribosa, la biosíntesis de los ribonucleótidos púricos comienza con la ribose-5-fosfato y sobre él, se construye el anillo de purina en etapas sucesivas. El primer nucleótido formado por esta vía es el inosinato (IMP).

Síntesis de 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP) a partir de ribosa-5-fosfato



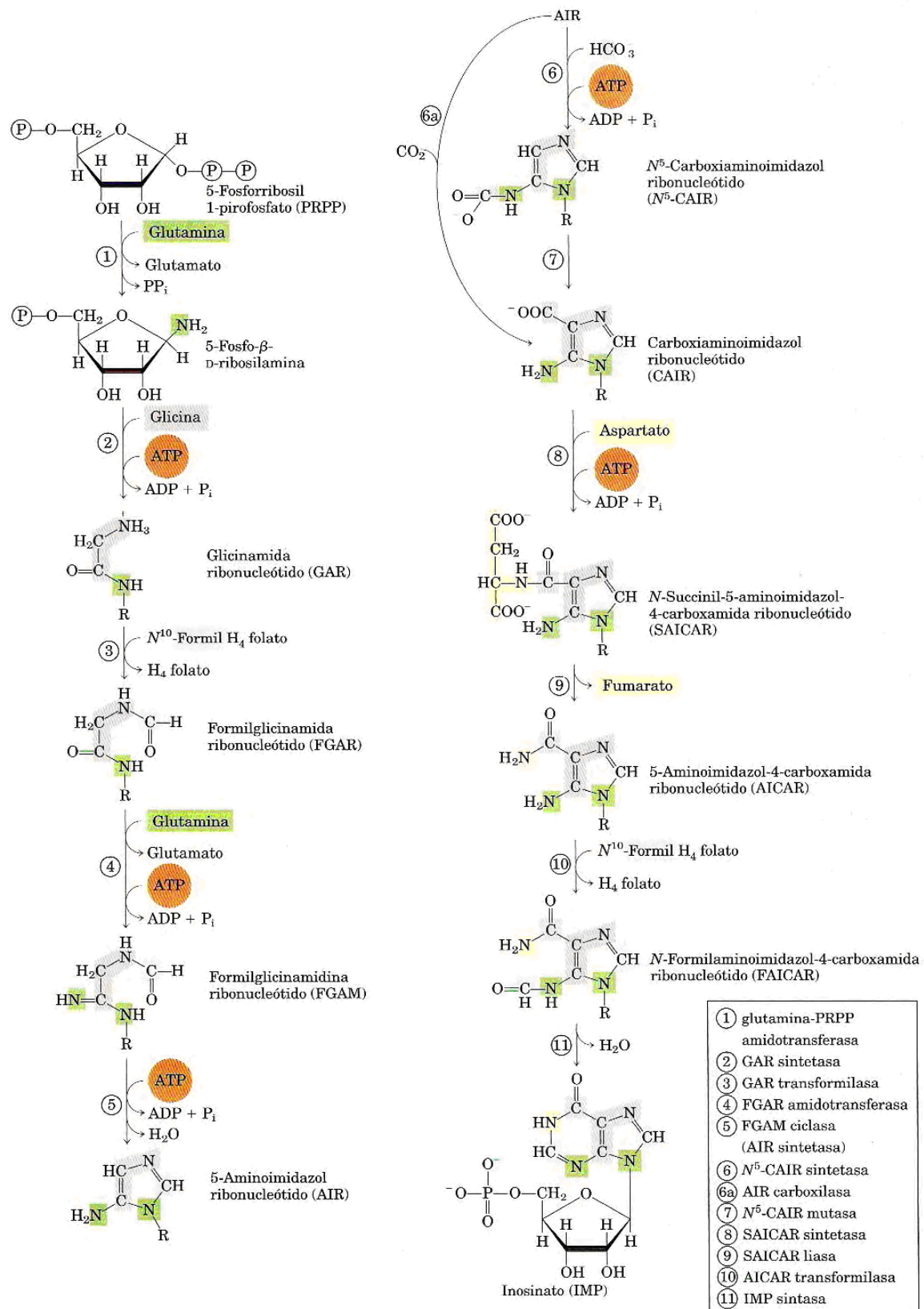


Fig. 7.2. Nucleótidos púricos: síntesis de ácido inosínico (IMP). Nelson D.L. and Cox M.M., "Lehninger. Principios de Bioquímica", 2008.

Los nucleótidos de purina AMP y GMP, derivan del monofosfato de inosina (IMP) como se indica en el siguiente esquema:

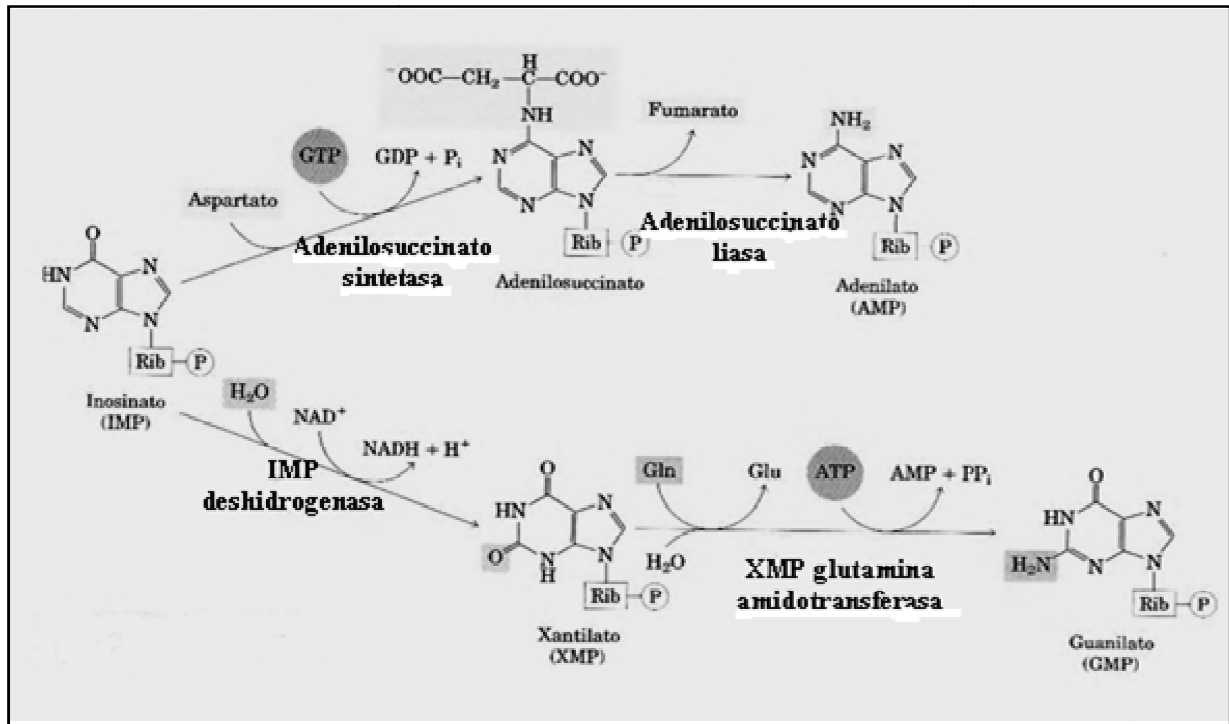
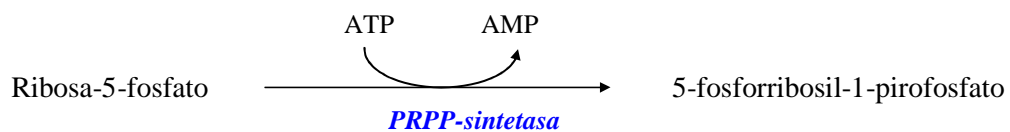


Fig. 7.3. Conversión de ácido inosínico en AMP y GMP. Nelson D.L. and Cox M.M. "Lehninger. Principios de Bioquímica", 2008.

Regulación de la síntesis de purinas

La síntesis de nucleótidos púricos es regulada por retroalimentación en varios niveles:

- a) Formación de PRPP (5 fosforribosil-1-pirofosfato) por la enzima *PRPP-sintetasa*.



- b) Etapa que va desde PRPP a fosforribosilamina catalizado por la enzima amidofosforribosiltransferasa, que es el principal sitio de control. Los nucleótidos AMP, ADP, ATP, GMP, GDP y GTP actúan como inhibidores.



- c) En la vía de bifurcación del IMP para la formación de ATP y GMP. El GTP es utilizado en la síntesis de AMP, mientras que el ATP se utiliza en la síntesis de

GMP. Esto lleva que haya un equilibrio en la síntesis de los ribonucleótidos de adenina y guanina. Cuando se acumula GTP se activa la enzima adenilo succinato sintetasa produciéndose más ATP. Cuando se acumula ATP se activa la enzima GMP-sintetasa aumentando los niveles de GTP.

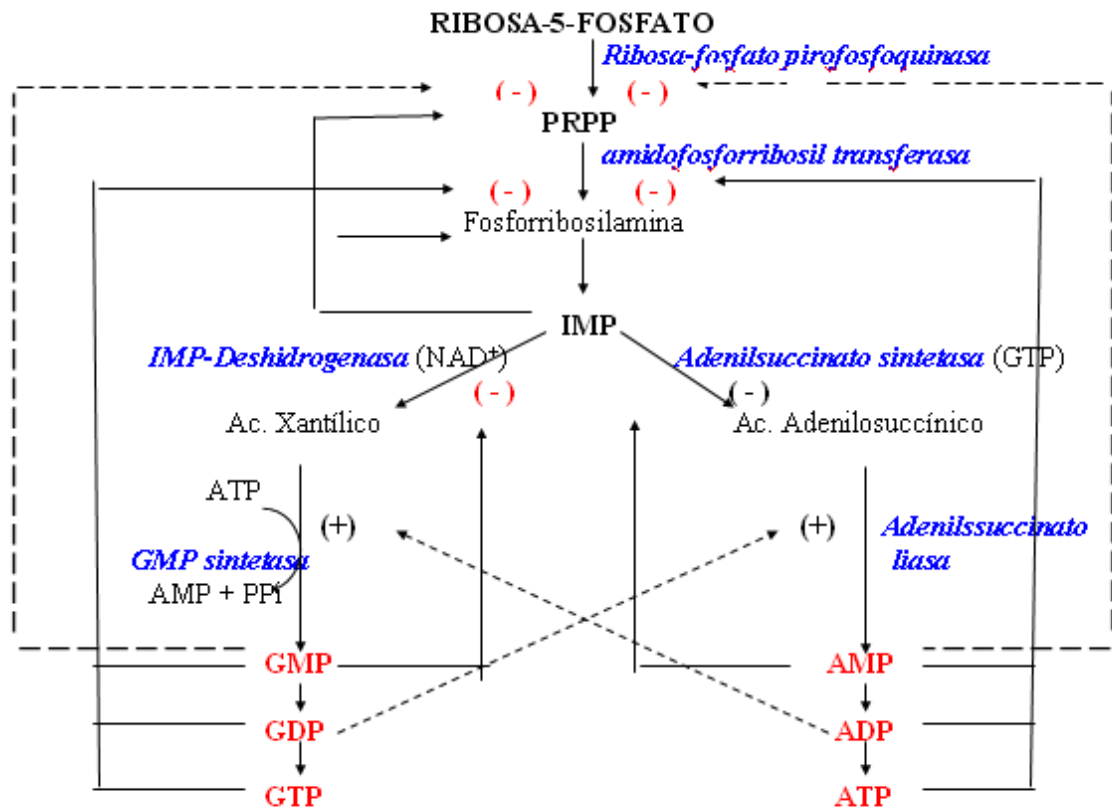
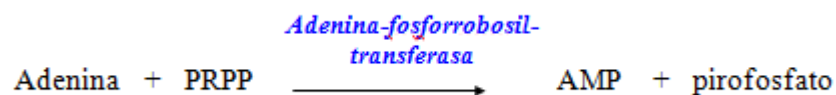


Fig. 7.4. Regulación de recíproca de la síntesis de GTP y ATP.

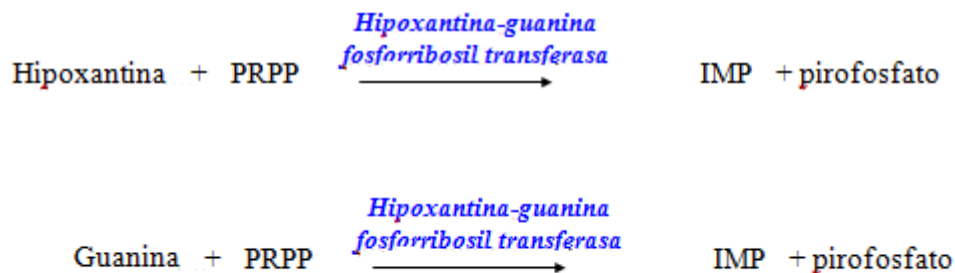
PRPP glutamil amido transferasa también es inhibida por IDP e ITP.

Vía de recuperación de purinas

Las bases púricas libres, ya sean que procedan de la alimentación o del catabolismo de los ácidos nucleicos, pueden ser recicladas en AMP o GMP. El mecanismo principal reside en la reacción de la *adenina-fosforribosil-transferasa*:



En una reacción semejante, la hipoxantina y la guanina son transformadas en los nucleótidos correspondientes por acción de la *hipoxantina-guanina fosforribosil-transferasa*.



Biosíntesis de nucleótidos pirimídicos

La biosíntesis de los nucleótidos de pirimidina transcurre de una manera algo diferente de la de los nucleótidos de purina. En este caso el anillo de pirimidina se sintetiza primero y luego se une al fosfato de ribosa.

Se necesita carbamil fosfato y aspartato como precursores. La contribución de ambos compuestos en la formación del anillo de pirimidina se puede representar así:

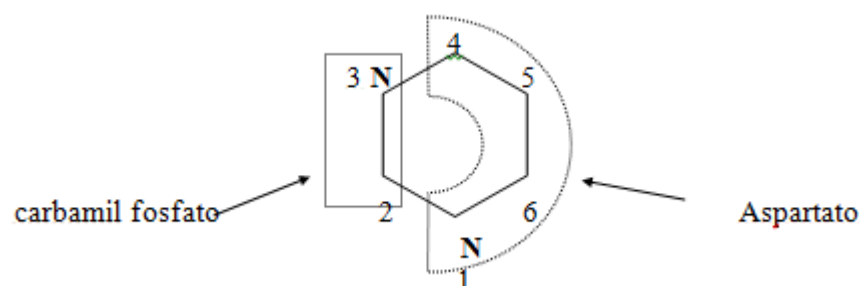
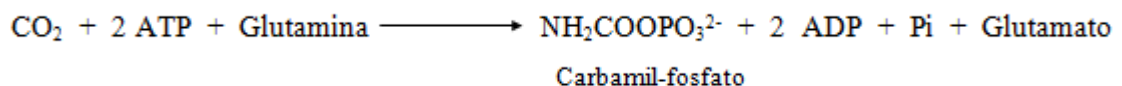
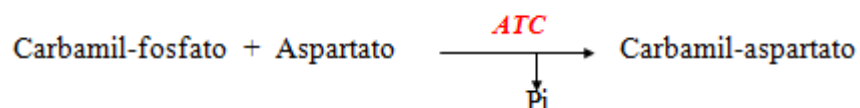


Fig. 7.5. Origen de los átomos de carbono y nitrógeno que constituyen el anillo de pirimidina.

El primer paso de la síntesis es la formación del carbamilo-fosfato. El grupo amino procede de la desaminación de glutamina. La reacción catalizada por una *carbamil fosfato sintetasa* se puede representar:



Una vez formado el carbamil-fosfato, se combina con aspartato para formar carbamil-aspartato. La reacción es catalizada por la *aspartato transcarbamilasa* (ATC).



Después de tres pasos se obtiene el primer nucleótido de pirimidina (UMP) el cual se convierte posteriormente en UTP y CTP. La biosíntesis de los nucleótidos pirimidínicos está regulada a nivel de la enzima alostérica *aspartato transcarbamilasa*, la cual es inhibida por retroalimentación por el CTP (citidin trifosfato), producto final de la vía.

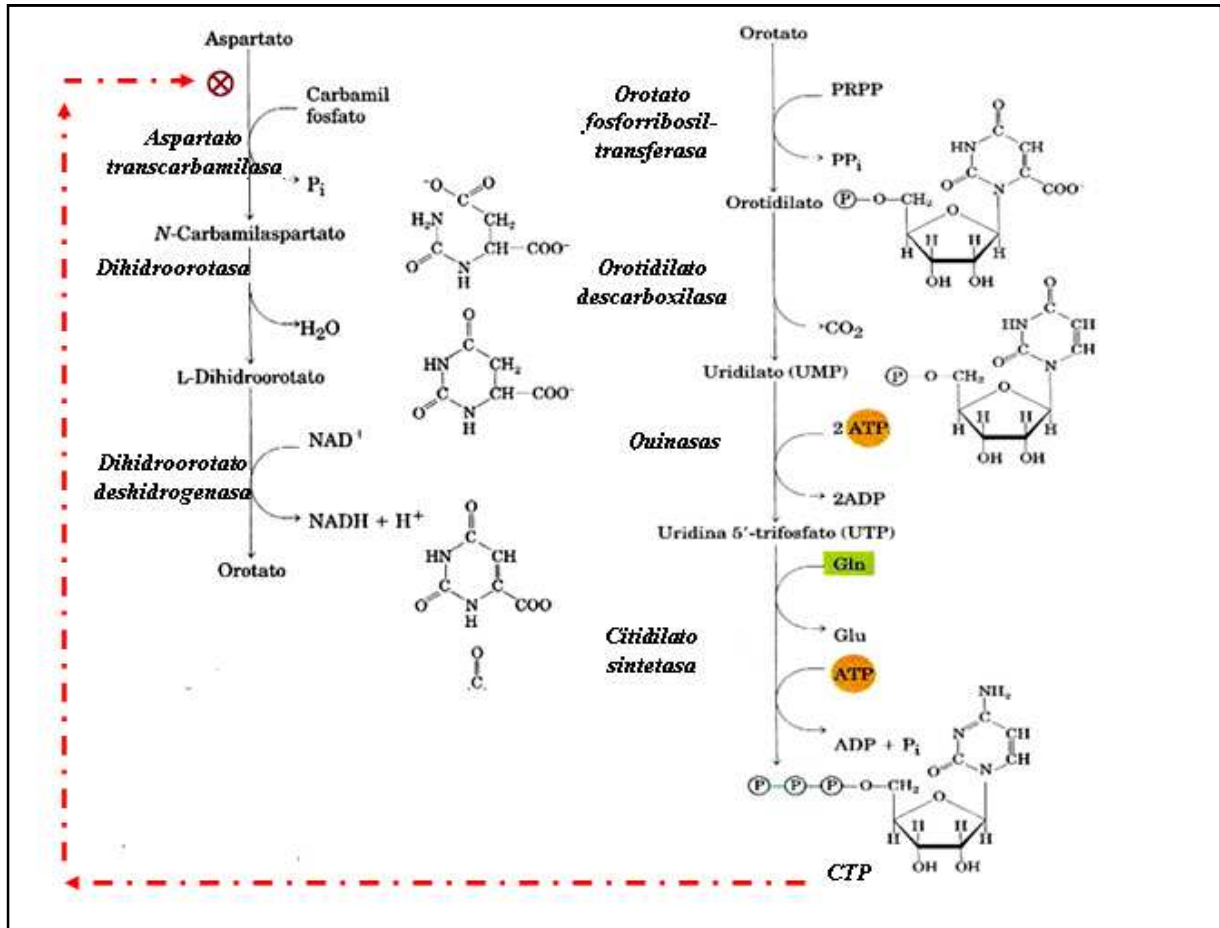
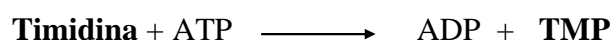
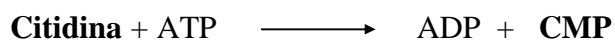
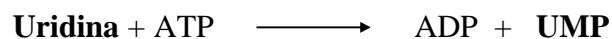


Fig. 7.6. Esquema de las reacciones involucradas en la síntesis CTP. Nelson, D.L. and Cox, M.M. "Lehninger. Principios de Bioquímica", 2008.

Recuperación de bases pirimidínicas

Las células de mamíferos no poseen mecanismos para recuperar nucleótidos a partir de bases libres, sin embargo poseen vías de recuperación para convertir nucleósidos (uridina, citidina y timidina) en los nucleótidos correspondientes.



Biosíntesis de desoxirribonucleótidos

Normalmente los desoxirribonucleótidos no se sintetizan a partir de la desoxirribosa como elemento de construcción, sino que se forman por reducción directa del carbono 2' de los correspondientes ribonucleótidos.

Esta vía ha sido muy estudiada en *E. coli*, donde los 4 ribonucleósidos difosfatos (ADP, GDP, UDP, CDP) son directamente reducidos a los correspondientes desoxi-análogos (dADP, dGDP, dUDP, dCDP). La reacción es catalizada por la ribonucleósido difosfato reductasa, enzima que requiere NADPH y tiorredoxina.

En el siguiente esquema se muestra la reducción en general de los nucleósidos difosfatos en los correspondientes desoxi-nucleósidos difosfatos.

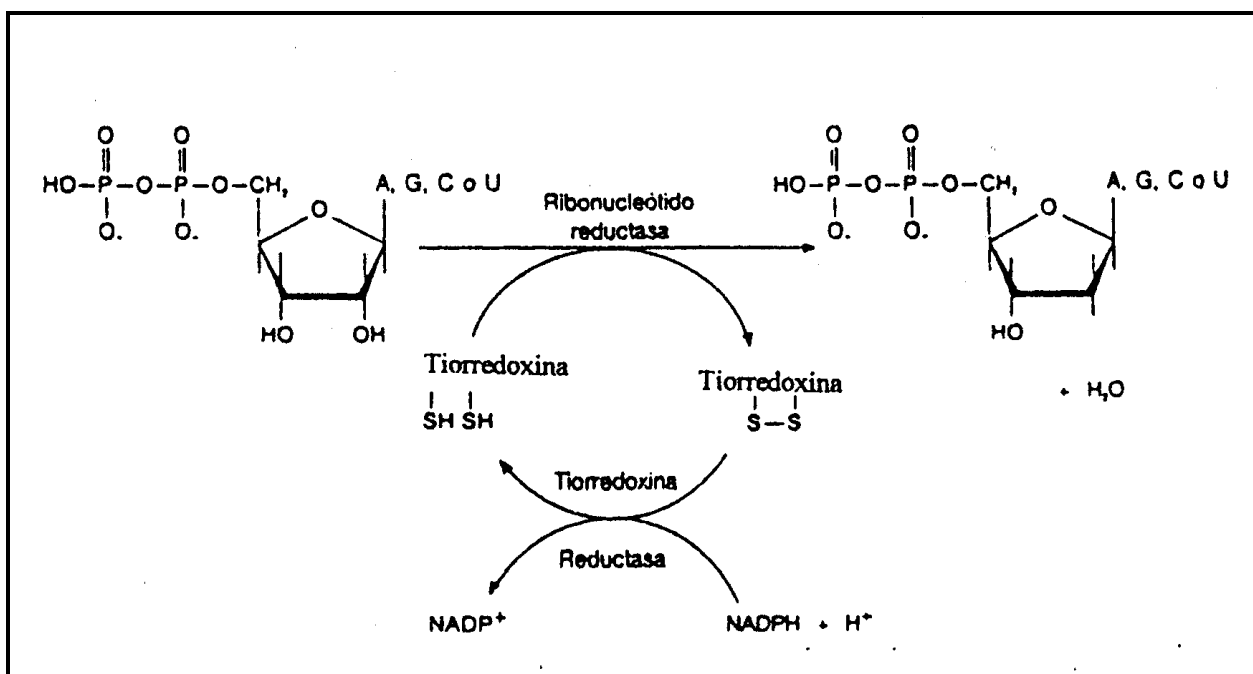


Fig. 7.7. Biosíntesis de desoxirribonucleótidos a partir de ribonucleótidos.

El control alostérico se realiza a nivel de la enzima **ribonucleótido difosfato reductasa**. El dATP actúa como inhibidor general de todos los ribonucleósidos-5-difosfatos. Como el DNA contiene **timina** en lugar de **uracilo**, el **d-TMP** (ácido desoxitimidílico) se forma a partir del **d-UMP** (ácido desoxiuridílico) por acción de la enzima **timidilato sintetasa**, actuando el N^5N^{10} **Metilén-FH₄** como dador del grupo metilo.

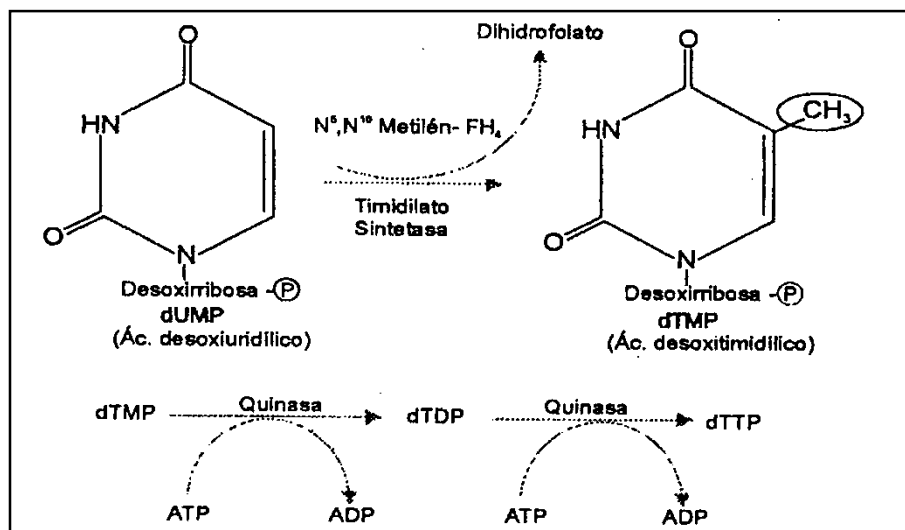


Fig. 7.8. Esquema de biosíntesis de ácido desoxitimidílico (dTMP).

Catabolismo de purinas

Si las bases libres no son recuperadas y reutilizadas, son degradadas y sus productos finales excretados. La degradación de purinas a ácido úrico ha sido muy estudiada. Las principales purinas, adenina y guanina, se convierten en xantina, la cual es oxidada a ácido úrico por la acción de la enzima *xantina oxidasa*.

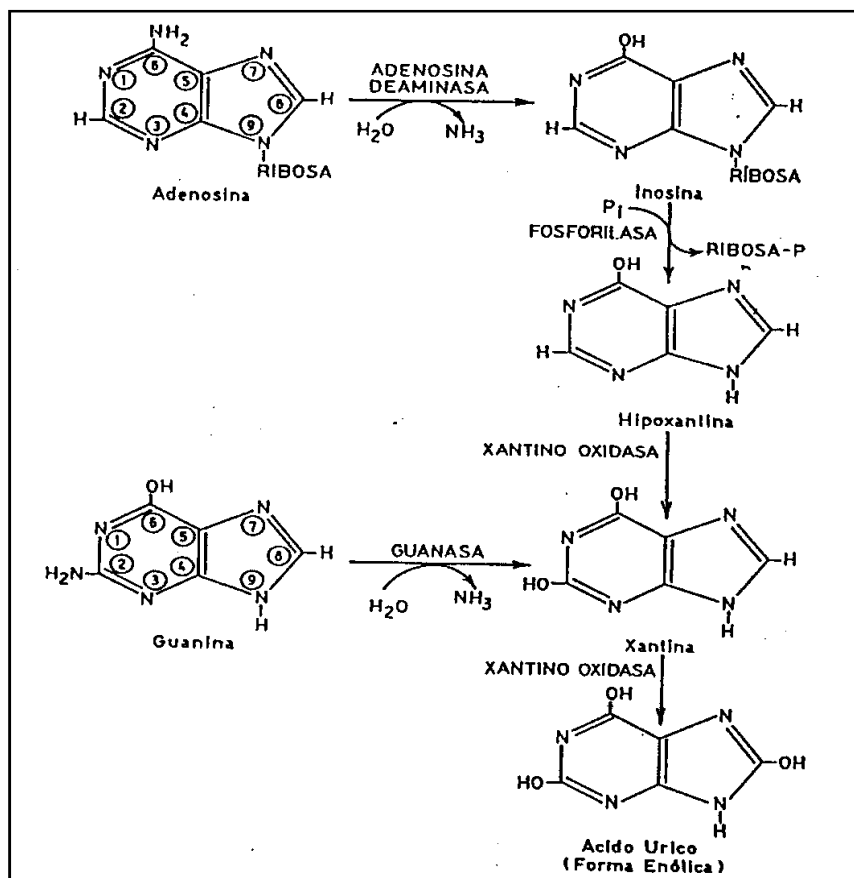


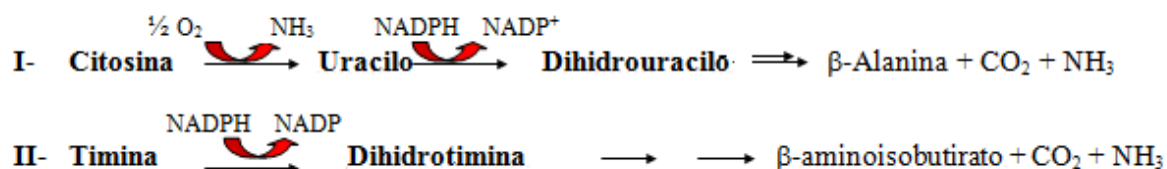
Fig. 7.9. Catabolismo de bases púricas: formación de ácido úrico. Blanco, A. "Química Biológica", 2006.

Degradación de las bases pirimidínicas

El catabolismo de las pirimidinas ocurre principalmente en el hígado y da por resultado la producción de una serie de productos finales altamente solubles. Esto es opuesto a lo que ocurre en el catabolismo de las purinas donde se producen compuestos escasamente solubles: ácido úrico y urato de sodio

El desprendimiento de CO_2 respiratorio a partir del C2 del núcleo pirimidínico, representa una vía importante para el catabolismo de uracilo, citosina y timina. La β -alanina y el ácido β -aminoisobutírico son los principales productos finales del catabolismo de estas bases.

En pacientes leucémicos y en los sometidos a tratamientos con rayos X se produce un aumento en la eliminación de β -aminoisobutírico, como índice de la degradación exagerada del ADN.



Origen del tetrahidrofolato y sus transformaciones a derivados transportadores de un carbono

El ácido fólico, que se encontró primeramente en las hojas de espinaca, está ampliamente distribuido en las plantas. Su deficiencia en mamíferos provoca una disminución de crecimiento y aparición de diversas formas de anemias.

Contiene tres sillares característicos:

- una pteridina sustituida
- ácido p-aminobenzoico
- ácido glutámico.

El síntoma bioquímico más sobresaliente de la deficiencia de ácido fólico es el impedimento de la biosíntesis de las purinas y de la timina (pirimidina). La forma coenzimática del ácido fólico actúa en la transferencia de ciertos fragmentos monocarbonados utilizados en ésta y otras rutas biosintéticas.

El ácido tetrahidrofólico (FH_4) actúa como transportador intermediario de grupos hidroximetilos, formilo y metilo, en gran número de reacciones enzimáticas.

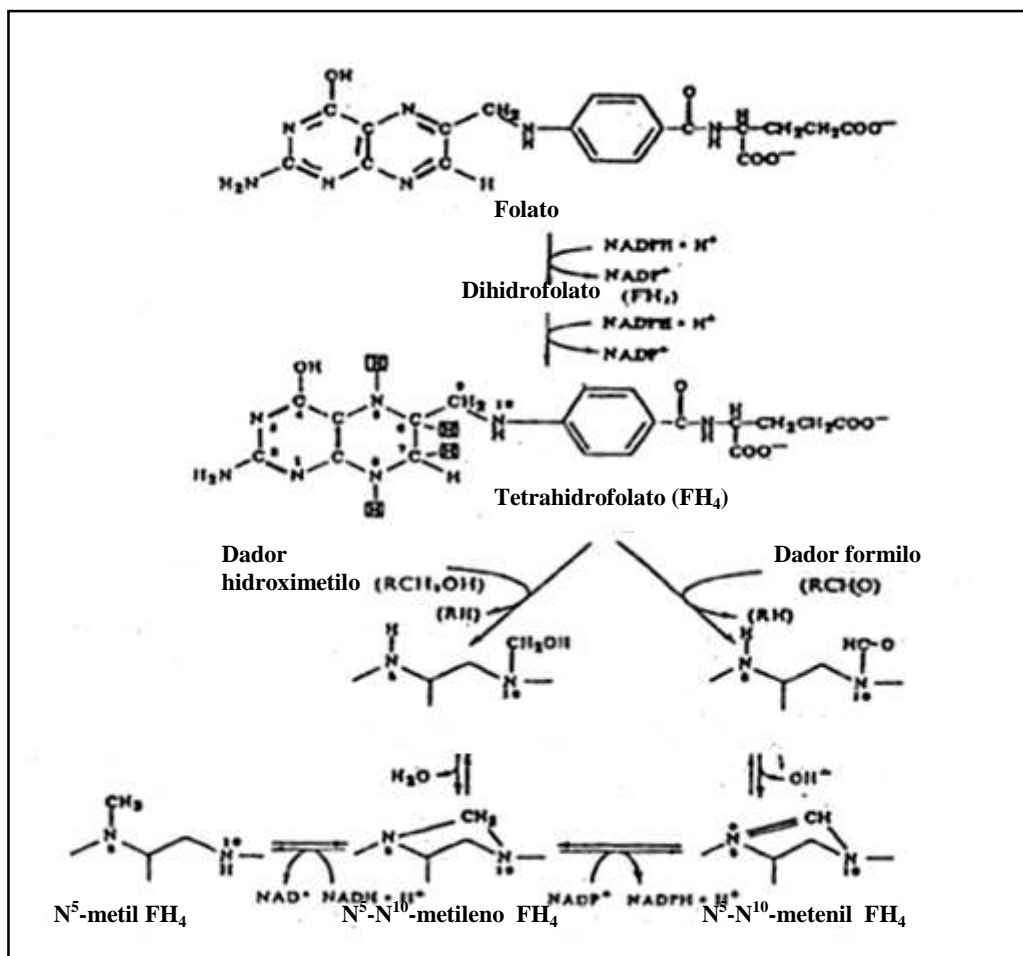


Fig. 7.10. Reacciones químicas involucradas en la formación de los derivados de folato. Nelson D.L. and Cox M.M. "Lehninger. Principios de Bioquímica", 2008.

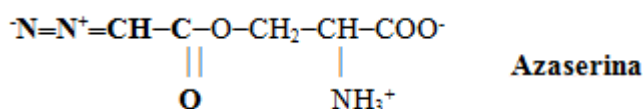
PROBLEMAS A RESOLVER

1) A pesar de que las células de *E. coli* normales pueden sintetizar todos los aminoácidos, algunos mutantes, llamados auxótrofos para los aminoácidos, son incapaces de sintetizar algunos aminoácidos específicos. Considerar los tres auxótrofos para aminoácidos que son incapaces de sintetizar glicina, glutamina y aspartato. Para cada mutante, ¿qué productos celulares nitrogenados, además de las proteínas, tendrán problemas para ser sintetizados?

2) Indicar la(s) posición(es) en el anillo purínico y/o pirimídico que se marcará(n) isotópicamente durante la síntesis en las células expuestas a:

- a) ^{15}N -aspartato
- b) ^{14}C -serina (grupo hidroximetilo marcado)
- c) ^3H -Oxalacetato (marcado uniformemente)

3) Las amidotransferasas, son inhibidas por el antibiótico azaserina que es un análogo de la glutamina.



¿Qué intermediarios de la síntesis de purinas se acumularían en las células tratadas con azaserina?

4) El ácido inosínico (IMP) y el ácido guanílico (GMP) son importantes potenciadores del flavor después del sacrificio en el músculo animal destinado a alimentación. Dentro de los productos de degradación del IMP se encuentra la hipoxantina, la cual le da un sabor amargo y olores anormales al pescado almacenado.

En la Tabla se muestran las concentraciones en $\mu\text{mol/g}$ de los productos de degradación de los nucleótidos en el bacalao a los 2, 7 y 11 días de su almacenamiento a 0°C .

Tiempo (días)	ATP	IMP	Inosina	Hipoxantina
2	1,3	4	2,5	0
7	0	3,8	4,5	0,5
11	0	0	1,5	5,5

Analice los datos de la tabla e indique las mediciones que realizaría en el laboratorio para determinar la frescura del bacalao que se vende en el mercado.

5) Derivados del tetrahidrofolato son utilizado en la síntesis de purinas, pirimidinas, serina, glicina, etc., lo que demuestra la importancia del contenido de esta vitamina en los alimentos. El folato proveniente de la dieta se absorbe en la mucosa intestinal y en dos pasos enzimáticos se reduce a tetrahidrofolato (FH_4), forma activa de la coenzima. Alimentos ricos en folatos son: repollo, semillas de soja, hígado, leche de vaca, etc. Es importante conocer las pérdidas de folato que se producen en diversos alimentos sometidos a diferentes tipos de tratamientos tecnológicos como así también la forma de disminuir dichas pérdidas.

Teniendo en cuenta lo expuesto:

- Esquematice la reacción de formación de FH_4 a partir de folato.
- Indique las enzimas que interviene en la síntesis de nucleótidos púricos y pirimidínicos que utilizan como coenzima FH_4 ó sus derivados metilados.
- Investigue los tratamientos tecnológicos que producen pérdidas de folatos en alimentos e indique soluciones aplicables a este problema.

GUÍA DE ESTUDIO

- En la biosíntesis del fosforribosil pirofosfato ¿qué compuestos se requieren?
- ¿Qué compuestos ó intermediarios son comunes en la biosíntesis de los nucleótidos púricos y pirimidínicos?

Nucleótidos púricos:

- Mencione las dos bases púricas que obtiene a partir del IMP.
- ¿De qué sustancia proviene cada uno de los átomos que conforman el anillo de purina?
- ¿Cuáles son los compuestos necesarios para su biosíntesis?
- ¿A nivel de qué enzimas está regulada su biosíntesis?
- Formule las reacciones de degradación de adenina hasta ácido úrico.
- En la vía de recuperación de bases púricas ¿Qué enzima interviene en cada una de las reacciones?

Nucleótidos pirimidínicos:

- ¿Cuáles son las bases pirimidínicas que conoce?

- ¿De qué compuesto proviene cada uno de los átomos que conforman el anillo pirimidínico?
- Formule la primera reacción de la biosíntesis de nucleótidos pirimidínicos.
- ¿Qué enzima interviene en su regulación y cuál es el compuesto que la inhibe?
- ¿Cuáles son los productos del catabolismo de las bases pirimidínicas?

Desoxirribonucleótidos:

- En la biosíntesis de los desoxirribonucleótidos ¿Qué átomo de carbono se reduce y cuál es la enzima que cataliza la reacción?
- Mencione los desoxirribonucleótidos que conoce.
- Esquematice la síntesis de desoxitimidínmonofosfato indicando enzima y cofactores.

BIBLIOGRAFÍA

- Blanco, A., “Química Biológica”, Ed. El Ateneo, 8^{va}. ed., Bs. As. (2006).
- Fennema, O., “Química de los Alimentos”. 2^{da} ed. Acribia S.A. España (2000).
- Nelson D., Cox M. “Lehninger. Principios de Bioquímica”, Ed. WH Freeman, 5^{ta}. ed., Inglaterra (2008).Cap. 22.

TRABAJOS PRÁCTICOS DE LABORATORIO

NORMAS DE SEGURIDAD EN EL LABORATORIO

Las normas de seguridad están hechas para la protección de la vida de cada persona que se encuentre en Laboratorio, y por lo tanto son normas básicas de cumplimiento **OBLIGATORIO**.

VESTIMENTA ADECUADA EN EL LABORATORIO

- 1) No se permitirá la entrada a los Trabajos Prácticos de Laboratorio con pantalones cortos, calzado descubierto o cabello largo suelto.
- 2) El uso del **guardapolvo** y **guantes de látex** es obligatorio. El uso de barbijo y lentes será obligatorio en el Trabajo Práctico que así lo requiera, lo cual será debidamente informado.

NORMAS DE COMPORTAMIENTO EN EL LABORATORIO

- 1) Está terminantemente prohibido fumar, comer, e ingerir bebidas en el laboratorio.
- 2) Los pasillos de circulación, vías de evacuación y puertas de emergencia no deben estar obstruidas.
- 3) Deberá mantener su mesada y pileta limpias. Para ello a cada Trabajo Práctico **debe** traer una rejilla o repasador limpio.
- 4) Al comenzar el Trabajo Práctico, asegúrese de que todo el material esté limpio y seco para evitar inexactitudes.
- 5) No malgaste los reactivos. No los impurifique con pipetas sucias, esto perjudicará su trabajo y el de sus compañeros. Nunca devuelva al recipiente original una sustancia que se ha sacado del mismo, pues podría contaminarla.
- 6) Los tips y pipetas, luego de ser utilizados, deberán ser descartados dentro de los correspondientes recipientes con lavandina, para una descontaminación previa al lavado final. **No los deje apoyados sobre la mesada.**
- 7) Cuando trabaje con material biológico (sangre total, suero, orina) siempre considérelo material **infectocontagioso**.
- 8) No deberá pipetear ácidos, álcalis, o cualquier producto corrosivo o tóxico, con la boca, use siempre propipeta. Si algún reactivo es accidentalmente ingerido, **avise de inmediato** al personal docente.
- 9) Si algún líquido corrosivo toca su cuerpo, use la **ducha** y lave la zona afectada con abundante agua. Si resultan afectados los ojos, use el **lavaojos** durante 15 minutos, luego solicite los primeros auxilios.
- 10) Todas las operaciones que desprendan gases tóxicos y/o irritantes deberán efectuarse bajo la campana extractora sin excepción.
- 11) En caso de derrame de ácidos ó solventes se procederá a volcar sobre el mismo un balde de arena destinado a tal fin.

USO Y TRATAMIENTO DE REACTIVOS Y SOLUCIONES QUÍMICAS

- 1) Al usar cualquier tipo de reactivo, asegúrese que es el correcto y lea bien su etiqueta. Si es transferido a otro recipiente, rotúlelo de nuevo.
- 2) No utilizar reactivos sin haber registrado sus propiedades en el cuaderno de laboratorio, enterándose de los riesgos de su uso y tomando las precauciones pertinentes.
- 3) Todos los reactivos deberán manejarse con el material perfectamente limpio. Todos los sólidos deberán manejarse con espátula.
- 4) No manipular productos inflamables (benceno, tolueno, éter, etc.) en presencia de mecheros encendidos.
- 5) Dilución de ácidos: cuando realice la dilución de un ácido proceda a añadir lentamente el ácido al agua contenida en un vaso de precipitación, agitando constantemente y enfriando el vaso receptor. Nunca añadir agua al ácido (*no se debe bañar el ácido*).
- 6) Cuando un reactivo requiera una agitación vigorosa por inversión del recipiente, tápelo con un tapón de vidrio esmerilado o de goma, nunca lo haga con la mano.
- 7) Al calentar una solución y/o reactivo, hágalo en recipientes adecuados para ese efecto.
- 8) Al calentar una solución en un tubo de ensayo debe hacerse bajo el nivel del líquido y agitando constantemente. No apuntar el tubo hacia compañero o a sí mismo, pues puede proyectarse.
- 9) Cualquier material caliente debe colocarse sobre una placa resistente al calor.
- 10) Algunos desperdicios líquidos (aquellos que posean un rango de pH moderado de 6-8), podrán desecharse en las piletas de descarga dejando correr suficiente agua, ya que muchos de ellos pueden ser corrosivos. Soluciones alejadas de estos pH deberán primero ser neutralizadas antes de ser desechadas.
- 11) Todos los desperdicios sólidos y papeles, no patológicos o contaminantes, deberán colocarse en los botes de basura. Los residuos sólidos patológicos o contaminantes deberán desecharse en los recipientes con bolsas rojas destinados a tal fin. El material de vidrio roto deberá descartarse en recipientes especiales para ese efecto.
- 12) Luego de finalizado el Trabajo Práctico, lave el material, enjuáguelo con agua destilada y déjelo secar.
- 13) Controle que todo el instrumental que utilizó (espectrofotómetro, centrifugas, peachímetro, etc.) quede limpio, apagado y cubierto con su funda si fuera necesario.
- 14) Las bromas en su trabajo pueden causar accidentes, no las haga, trabaje con seriedad pensando que está próximo a desempeñarse como profesional. En el Laboratorio no corra, camine.

TRABAJO PRÁCTICO N°1

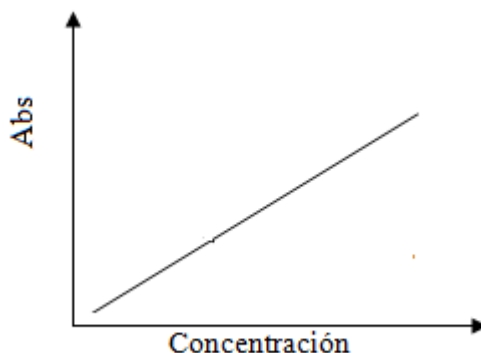
CURVA DE CALIBRACIÓN

OBJETIVOS

- ✚ Comprender el fundamento de la utilización de curvas de calibración para obtener el valor de concentración de una sustancia en solución.
- ✚ Realizar la curva de calibración de azúcares reductores que luego se utilizará en el trabajo práctico de actividad de invertasa.

INTRODUCCIÓN

Si se diluye sucesivamente una sustancia coloreada y se mide, de cada dilución, el valor de absorbancia a una longitud de onda (λ) óptima y constante, la representación gráfica de esos valores (absorbancia en ordenadas vs concentración en abscisas) da lugar a la obtención de una Curva de Calibración de dicha sustancia.



La curva de calibración es una curva de referencia y la sustancia que se utiliza para su construcción es considerada como un patrón, estándar, o testigo. En muchas determinaciones se cumple una relación proporcional entre la magnitud o **intensidad de color** del producto de una reacción y la **cantidad del reactivo** que la genera. Esta relación lineal no se obtiene en todo el rango de concentraciones posibles sino dentro de un conjunto de valores que dependen de numerosos factores dependientes del método de medición.

A partir de una curva de calibración, es posible conocer la concentración de una determinada sustancia en una muestra dada. Para ello, se mide la absorbancia de la muestra a la misma longitud de onda utilizada para obtener la curva de calibración y, con base en ese valor se interpola para obtener el valor de concentración. Por ejemplo, es posible determinar la concentración de proteínas en solución en una muestra, a partir

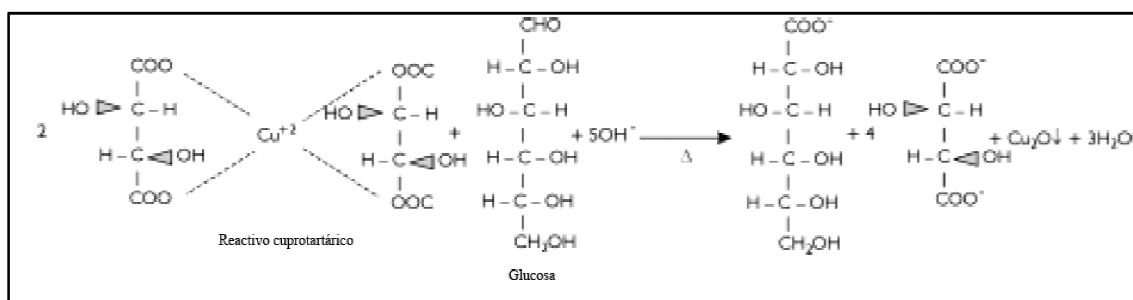
de una curva graficada utilizando como patrón, una solución de concentración conocida de albúmina bovina.

Método colorimétrico de Nelson y Somogyi

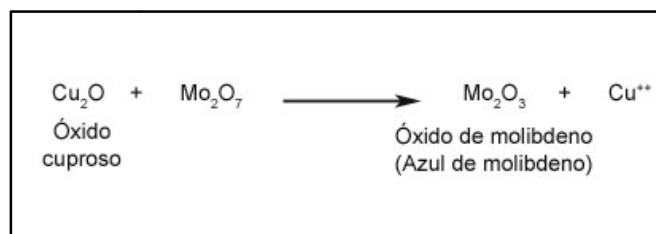
Los azúcares con propiedades reductoras son aquellos que presentan un grupo cetona o aldehído libre, mediante el cual pueden reaccionar cediendo electrones a otros compuestos. Entre estos azúcares, conocidos en general como “azúcares reductores”, se encuentran glucosa, maltosa, lactosa y galactosa. El método de Nelson y Somogyi, es un método colorimétrico ampliamente utilizado para la determinación de azúcares reductores.

Fundamento del método

Los azúcares reductores cuando son calentados en presencia del reactivo cuprotartárico en medio alcalino moderado, reducen el cobre del estado cúprico a cuproso, formándose Cu_2O .



Cuando el Cu_2O reacciona con el ácido arsenomolibdico, el ácido molibdico se reduce a molibdeno y forma óxidos de molibdeno de menor valencia, color verde azulado, cuya intensidad de absorción a 620 nm es proporcional a la cantidad de azúcares reductores presentes. El color es estable entre los 15 y 30 minutos después de agregado el reactivo final.



Procedimiento general

En primer lugar, la solución de glucosa que se utilizará para realizar la curva de calibración, será tratada con agentes precipitantes de proteínas (NaOH y ZnSO_4) y luego filtrada. Estos pasos se realizan para igualar las condiciones de reacción con aquellas

que se utilizarán en el T.P N° 2 para la determinación de la actividad de la enzima invertasa.

Sobre una alícuota de solución de glucosa desproteinizada y filtrada, se adiciona el reactivo cuprotartárico y se mezcla rotando suavemente. Calentar en baño maría hirviendo durante 10 min. Enfriar bajo agua corriente sin agitación violenta para evitar la reoxidación del Cu_2O por el oxígeno del aire. En frío, se agrega el reactivo arsenomolibdico. Leer en espectrofotómetro a 620 nm entre los 15 y 30 minutos después de agregado el reactivo final.

Reactivos

Glucosa..... 0,003M

NaOH 0,6N

ZnSO_4 0,6N

Reactivo cuprotartárico:

Solución A:..... Sulfato de cobre al 2%
.....Sulfato de sodio anhidro al 3 %.

Solución B:..... Carbonato de sodio anhidro a 3%
..... Bicarbonato de sodio al 2%
..... Tartrato de sodio y potasio al 1.5 %

Sulfato de sodio anhidro al 12%

En el momento de usar, mezclar 1 volumen de A y 4 volúmenes de B.

Reactivo arsenomolibdico:

Solución A:..... Molibdato de amonio 25g

..... Ácido sulfúrico conc. 21 ml

..... H_2O destilada 450 ml

Solución B:.....Arseniato disódico.7 H_2O 3g

..... H_2O destilada 25 ml

Mezclar y mantener a 37 °C durante 24 h. Guardar en frasco color caramelo.

Actividades a desarrollar

Para la realización de la técnica, preparar la siguiente serie de tubos y agregar los reactivos que se indican a continuación:

Tubos N°	1 (bco)	2	3	4	5	6
NaOH 0,6 N (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Glucosa 0,003 M (ml)	-	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ZnSO ₄ 0,6 N (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
H ₂ O d. (ml)	8,0	7,8	7,6	7,4	7,2	7,0
Mezclar bien y filtrar Recibir el filtrado en los tubos de filtrado (F), cuyo subíndice corresponde al número de tubo del que proviene la mezcla						
Tubos de filtrado	F-1	F-2	F-3	F-4	F-5	F-6
Tomar 0,5 ml de cada filtrado y trasvasar a los tubos de colorimetría (C) correspondientes, para efectuar la reacción de color						
Tubos de colorimetría	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Filtrado (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Rvo. Cuprotartárico (ml)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
Mezclar suavemente Colocar en baño maría hirviente durante 10 min. Enfriar con agua corriente y agregar:						
Rvo. arsenomolibdico (ml)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
H ₂ O d. (ml)	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Mezclar Leer Absorbancia en espectrofotómetro a 620 nm. Utilizar como blanco el tubo N° 1.						

Resultados obtenidos

Completar la tabla con los valores de absorbancia leídos para cada tubo, y los valores corregidos tras restar el blanco.

Tubo N°	1 (blanco)	2	3	4	5	6
Glucosa (μ moles)	0	0,6	1,2	1,8	2,4	3,0
Lectura de absorbancias a 620 nm						
Lectura corregida	----					

Realizar curva de calibración graficando las lecturas de absorbancia corregidas versus los μ moles de glucosa, obteniéndose una recta que pasa por el origen. Tener en cuenta que las concentraciones finales de glucosa son las indicadas en la tabla.





BIBLIOGRAFÍA

- Fennema, O., “Química de los Alimentos”. 2^{da} ed. Acribia S.A. España (2000), Cap. 6.
- Wilson K., Walker J., “Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology”, Ed. Cambridge University Press, 7^{ma} ed., New York (2010). Cap. 1.
- Somogyi M., 1952, Determination of reducing sugars by Nelson-Somogyi method. J.Biol.Chem., 200:245.

TRABAJO PRÁCTICO N° 2

ESTUDIO DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

OBJETIVOS

-  Adquirir destreza en la utilización del material de laboratorio.
-  Determinar la actividad enzimática de la enzima invertasa en un extracto de levadura.
-  Analizar la influencia del pH y diferente concentración de sustrato sobre la actividad enzimática.
-  Determinar gráficamente el valor de Km.

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

La cantidad de una enzima en una disolución determinada o un extracto de tejido, puede determinarse cuantitativamente en relación al efecto catalítico que produce.

Para lo anterior es necesario saber:

- 1- La estequiometría global de la reacción catalizada.
- 2- Si la enzima precisa la adición de cofactores (ej. iones metálicos o coenzimas).
- 3- La dependencia enzimática de las concentraciones de sustrato o de los cofactores; es decir el valor de Km para el sustrato y para el cofactor.
- 4- El pH óptimo de la enzima.
- 5- El rango de temperatura en el cual la enzima es estable y muestra actividad elevada.
- 6- Un procedimiento analítico sencillo para determinar la desaparición de sustrato o aparición de productos.

La actividad de una enzima puede determinarse midiendo la cantidad de producto formado, o de sustrato consumido, en un tiempo dado, en una mezcla que contenga todos los factores requeridos para la reacción. A fin de que la determinación guarde relación con la cantidad de enzima presente, es necesario medir la velocidad inicial, es decir aquella obtenida cuando todavía la cantidad de sustrato consumido es insignificante en relación con el total presente de la mezcla.

Para indicar la actividad de una preparación enzimática se utilizan distintas expresiones. Un modo habitual de indicar la actividad de una enzima es en **Unidades Internacionales**.

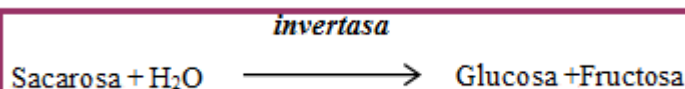
Una **Unidad de cualquier enzima** es la cantidad que cataliza la transformación de un micromol ($1 \mu\text{mol} = 10^{-6} \text{ mol}$) de sustrato por minuto, bajo condiciones definidas de pH y temperatura

$$\text{Unidad de Enzima} = \frac{\mu\text{mol de Sustrato Transformado}}{\text{min.}}$$

Diversos factores modifican la actividad enzimática, los cuales deben ser tenidos en cuenta para determinar la actividad de enzima presente en una muestra. Ellos son: **concentración de enzima, concentración de sustrato, temperatura, pH, concentración de cofactores y presencia de inhibidores.**

ACTIVIDAD ENZIMATICA DE INVERTASA EN LEVADURA INFLUENCIA DEL pH Y DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO

La invertasa es una enzima que se clasifica en la clase 3 de las hidrolasas y dentro de éstas en la subclase 3.2 de las glicosidasas, siendo específicamente una β -fructofuranosidasa. El sustrato principal de esta enzima es la sacarosa (disacárido no reductor) y la reacción es la siguiente:



La actividad de la enzima en estudio puede determinarse midiendo la concentración de los productos de hidrólisis (azúcares reductores) mediante el método colorimétrico de Nelson-Somogyi.

Procedimiento general

Para determinar la influencia del K_m y pH, se medirá la actividad de invertasa por un lado, utilizando distintas concentraciones de sacarosa (sustrato) y por otro, en buffer de diferentes pH. La invertasa será obtenida a partir de un extracto de levadura. El tiempo de reacción enzimática se controlará mediante la separación de la enzima por precipitación tras el agregado de NaOH y ZnSO_4 . El Zn(OH)_2 formado precipita y arrastra a las proteínas, incluida la enzima. Estas muestras se filtran y sobre una alícuota del filtrado se realiza la reacción de color. La actividad de la enzima se medirá mediante la detección de los productos de la reacción (azúcares reductores) utilizando el método de Nelson-Somogyi.

Obtención de la Enzima

La invertasa de la levadura se obtiene por lisis celular y suspensión acuosa, quedando dicha enzima en solución. El extracto centrifugado se utiliza sin más purificación. En un mortero se disgregan juntos: 5 g de levadura, 0,5 g de fosfato diamónico y 2 ml de tolueno. Se mezcla bien, homogeneizando la pasta perfectamente. Se deja 15 minutos a temperatura ambiente y se agrega, en pequeños volúmenes, 90 ml de agua destilada a 35°C, procurando deshacer y suspender bien todo el material con el pilón. Dejar luego en reposo durante 15 min., con agitación ocasional. Centrifugar a 3000 r.p.m. durante 15 min. Aspirar cuidadosamente el sobrenadante que contiene el extracto enzimático.

A) INFLUENCIA DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD DE INVERTASA

La actividad de la invertasa, como la de todas las enzimas, depende de la composición iónica del medio y muy especialmente del pH. Se estudiará la variación de esa actividad en medios de diferente pH. Se mantendrá constante toda otra variable que afecte la actividad enzimática.

- Buffer citrato pH = 3,0; 4,5 y 6,0
- Citrato trisódico 0,1M pH = 8,6
- Sacarosa 0,5M
- NaOH 0,6N
- ZnSO₄ 0,6N
- Reactivo cuprotartárico.
- Reactivo arsenomolibdico.
- Extracto enzimático: obtenido siguiendo la técnica anteriormente descripta.

Debe diluirse en una relación 1/20 en H₂O destilada.

Actividades a desarrollar

Para la realización de la técnica, ordenar en gradillas las siguientes series de tubos:

Tubos de reacción	R-1	R-2	R-3	R-4	
Tubos de desproteinizado	D-1	D-2	D-3	D-4	D-5 (Blanco)
Tubos de filtrado	F-1	F-2	F-3	F-4	F-5
Tubos de colorimetría	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5

Se aconseja trabajar en el orden que se indica a continuación:

- a) Colocar en los **tubos de reacción** los siguientes reactivos:

Tubo N°	R-1	R-2	R-3	R4
Buffer citrato pH 3,0 (ml)	5,0	----	----	----
Buffer citrato pH 4,5 (ml)	----	5,0	----	----
Buffer citrato pH 6,0 (ml)	----	----	5,0	----
Citrato trisódico (ml)	----	----	----	5,0
pH aproximado en el tubo	3,0	4,5	6,0	7,0
Luego agregar:				
Sacarosa 0,5 M (ml)	2,0	2,0	2,0	2,0
H ₂ O d. (ml)	2,0	2,0	2,0	2,0
Mezclar y dejar a temperatura ambiente Adicionar a c/tubo con pipeta distinta. Dejar la pipeta en el tubo correspondiente.				
Enzima (1/20) (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0
Mezclar Limpiar la pipeta con la mezcla reactiva aspirando y descargando el contenido				
Comenzar a contar el tiempo de 10 minutos Iniciar el protocolo de desproteinizado, en el tiempo de espera.				



b) Colocar en los **tubos de desproteínizado** los siguientes reactivos:

Tubos de	D-1	D-2	D-3	D-4	D-5 (Bco)
NaOH 0,6 N (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Al cabo del tiempo de reacción (10'), extraer 1 ml de mezcla de reacción de los tubos R (cada tubo con su pipeta) y dejarlo caer cerca del fondo de los tubos de desproteínizado D-1, D-2, D-3 y D-4 respectivamente, como se indica a continuación:					
Mezcla reactiva (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	----
ZnSO ₄ 0,6 N (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
H ₂ O d. (ml)	7,0	7,0	7,0	7,0	8,0
Filtrar Recibir el filtrado en los tubos de filtrado, F-1, F-2, F-3, F-4 y F-5 correspondientes.					
Tubos de Filtrado	F-1	F-2	F-3	F-4	F-5
Tomar 0,5 ml de cada filtrado Trasvasar a los tubos de colorimetría correspondientes, para efectuar la reacción de color					
Tubos de colorimetría	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
Filtrado (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Rvo. cuprotartárico (ml)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
Mezclar suavemente Colocar en baño maría hirviente durante 10 min. Enfriar con agua corriente y agregar en ml:					
Rvo. arsenomolibdico (ml)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
H ₂ O d (ml)	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Mezclar Leer absorbancia en espectrofotómetro a 620 nm. Utilizar como blanco el tubo N° 5.					

RESULTADOS

Con los datos obtenidos completar el siguiente cuadro:

Tubo N°	C-1	C-2	C-3	C-4
pH del medio	3,0	4,5	6,0	7,0
Absorbancia				



µmoles de sacarosa hidrolizada (sh)				
Velocidad inicial (sh ml ⁻¹ min ⁻¹)				

1. **Graficar** sacarosa hidrolizada en función del pH del medio.
2. **Graficar** velocidad inicial de reacción en función del pH.

B) DEPENDENCIA DE LA VELOCIDAD DE REACCION ENZIMÁTICA CON LA CONCENTRACION DE SUSTRATO

Determinación de la constante de Michaelis - Menten (Km)

Para obtener Km se miden las velocidades de reacción con cantidades constantes de enzima y concentraciones crecientes de sustrato, en un medio buffer acético - acetato de sodio a pH 4,77.

Reactivos

- Buffer acético - acetato pH 4,77
- Sacarosa 0.5 M
- Sacarosa 0.05 M
- NaOH 0.6 N
- Zn SO₄ 0.6 N
- Reactivo Cuprotartárico
- Reactivo Arsenomolibdico
- Extracto enzimático

Actividades a desarrollar

Para la realización de la técnica, ordenar en gradillas las siguientes series de tubos:

Tubos de reacción	1	2	3	(Bco)
Tubos de desproteinizado	D-1	D-2	D-3	D-4
Tubos de filtrado	F-1	F-2	F-3	F-4
Tubos de colorimetría	C-1	C-2	C-3	C-4

El extracto enzimático a usar debe ser diluido 1/30. Se aconseja trabajar en el orden que se indica a continuación:

- a) Colocar en los **tubos de reacción** los siguientes reactivos



Tubos de reacción	1	2	3
Buffer 0,1M, pH 4.77 (ml)	2,0	2,0	2,0
Sacarosa 0,5 M (ml)	-	-	2,0
Sacarosa 0,05 M (ml)	2,0	4,0	-
H ₂ O d. (ml)	5,0	3,0	5,0
<i>Mezclar y dejar a temperatura ambiente</i>			
Adicionar a c/tubo con pipeta distinta. Dejando la pipeta en el tubo correspondiente:			
Enzima (1/30) (ml)	1,0	1,0	1,0
Mezclar			
Limpiar la pipeta con la mezcla reactiva succionando y liberando el contenido			
Comenzar a contar el tiempo de 10 minutos			
En el tiempo de espera iniciar el protocolo de desproteínizado.			

Tubos desproteínizado	D-1	D-2	D-3	D-4(Blanco)
Na(OH) 0.6 N (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0
Al cabo del tiempo de reacción (10'), extraer 1 ml de mezcla de reacción (con su correspondiente pipeta) y dejarlo caer cerca del fondo de los tubos de desproteínizado correspondientes, como se indica a continuación:				
Mezcla reactiva (ml)	1,0	1,0	1,0	No contiene
ZnSO ₄ 0,6 N (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0
H ₂ O d (ml)	7,0	7,0	7,0	8,0
Filtrar				
Recibiendo en los tubos de filtrado (F), cuyo subíndice debe corresponder al número de tubo del que proviene la mezcla				
Tubos de Filtrado	F-1	F-2	F-3	F-4
Tomar 0.5 ml de cada filtrado. Trasvasar a los tubos de colorimetría correspondientes, para efectuar la reacción de color				
Tubos de colorimetría	C-1	C-2	C-3	C-4
Filtrado (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5
Rvo. Cuprotartárico (ml)	0,75	0,75	0,75	0,75

Mezclar suavemente Colocar en baño maría hirviendo durante 10 min. Enfriar con agua corriente y agregar en ml:				
Rvo. Arsenomolibdico	0,75	0,75	0,75	0,75
H ₂ O d.	3,0	3,0	3,0	3,0
Usando guantes de látex invertir los tubos tapándolos con el pulgar Eliminar las burbujas cuidadosamente Leer Absorbancia en espectrofotómetro a 620 nm Utilizar como blanco el tubo N° 4				

Resultados

Con los resultados obtenidos completar los siguientes datos:

Tubo N°	C-1	C-2	C-3	C-4
Concentración de sustrato	0.01 M	0.02 M	0.1 M	0 (blanco)
Absorbancia				
Absorbancia corregida				---
µmoles de sacarosa hidrolizada (sh)				---
Velocidad inicial (sh ml ⁻¹ min ⁻¹)				---

Formas gráficas para determinar Km:

1. **Graficar** los valores de actividad enzimática (V) en función de la concentración de sustrato ([S]). Estimar el valor aproximado de Km a partir de la gráfica.
2. Utilizando los valores recíprocos 1/V y 1/[S], **trazar una recta** según la ecuación de Lineweaver-Burk.
3. Determinar el **valor de Km** en la recta anterior

BIBLIOGRAFÍA

- Blanco, A., "Química Biológica", Ed. El Ateneo, 8^{va} ed., Bs. As. (2006). Cap.7.
- Nelson D., Cox M. "Lehninger. Principios de Bioquímica", Ed. Omega, 4^{ta} ed., Barcelona (2005). Cap.8.
- Somogyi M., 1952, Determination of reducing sugars by Nelson-Somogyi method.

J.Biol.Chem., 200:245.

- Voet, D., Voet, J.G. "Bioquímica" 3^{era} ed. Editorial Médica Panamericana S.A. Argentina (2006), Cap. 6.

TRABAJO PRÁCTICO N° 3

TRANSPORTE ELECTRÓNICO MITOCONDRIAL

FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

OBJETIVOS

- Describir el transporte de electrones a través de aceptores que experimentan cambios reversibles en su estado redox.
- Comprender y explicar los mecanismos de transformación de energía redox en energía química en forma de ATP: fosforilación oxidativa.
- Diferenciar la acción de inhibidores y desacoplantes sobre el transporte electrónico.
- Demostrar experimentalmente el transporte electrónico mitocondrial en una muestra de tejido animal.
- Comprobar empíricamente la inhibición competitiva de la enzima succinato deshidrogenasa.

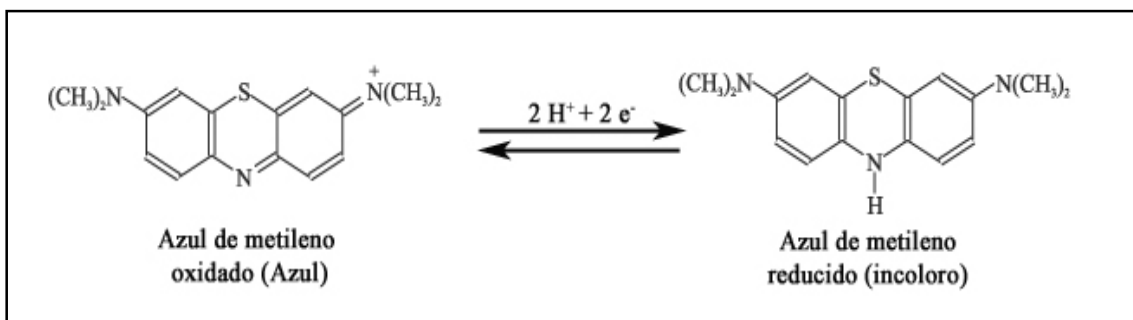
INTRODUCCION

En este trabajo de laboratorio se estudiará el funcionamiento de la cadena respiratoria, utilizando succinato como sustrato y azul de metileno como indicador. También en esta experiencia se verificará el efecto inhibitorio del malonato sobre la cadena respiratoria.

Existen algunas sustancias orgánicas no fisiológicas como el azul de metileno, que pueden intercalarse en la secuencia de reacciones de la cadena respiratoria, aceptando los electrones provenientes de la oxidación del sustrato. Estas sustancias son de enorme utilidad para estudiar la organización de la cadena respiratoria.

El azul de metileno es una sustancia auto-oxidante, es decir, puede ser oxidada directamente por el oxígeno molecular adquiriendo un color azul intenso. Al reducirse por captación de hidrógeno, el azul de metileno se decolora.

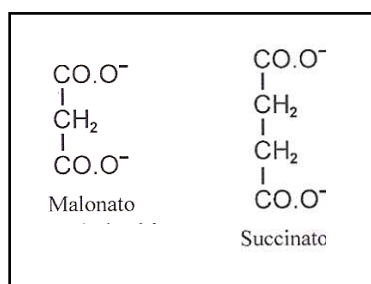
Aprovechando esta característica del azul de metileno, cuyo potencial de óxido reducción es $+0,01$, puede estudiarse la oxidación del ácido succínico a fumárico (potencial redox = $-0,030$), reemplazando a la CoQ como aceptora de electrones por el azul de metileno. La velocidad de decoloración del azul de metileno es proporcional a la actividad de la *succínico deshidrogenasa* (que utiliza FAD como grupo prostético) y que cataliza la reacción. La acción de inhibidores sobre esta enzima puede estudiarse comparando el tiempo de decoloración del azul de metileno con el tiempo de decoloración normal, en ausencia del inhibidor.



Preparación del extracto enzimático

Se utiliza corazón fresco de vaca, el que se corta en trozos pequeños, se pesan 16 gr y se homogeneizan junto con 40 ml de buffer fosfato pH 7,4 en una licuadora fría. Este preparado se centrifuga durante 10 min a 4000 r.p.m. El sobrenadante contiene entre otras, las enzimas de la cadena de transporte electrónico. El sobrenadante de la centrifugación a bajas revoluciones se puede centrifugar en ultracentrífuga durante 30 min. a 10.500 r.p.m. El precipitado se retoma con 5 ml de buffer y se homogeneiza. Este homogenato, está enriquecido en mitocondrias, y se puede utilizar como extractoenzimático).

En este trabajo práctico, se demostrará el transporte electrónico mitocondrial a través de la captación de hidrógenos por el azul de metileno y se realizará la inhibición competitiva de la succinato deshidrogenasa por malonato, cuya estructura molecular es muy semejante a la del sustrato de la enzima.



Reactivos

- Succinato de sodio 0,1 M
- Buffer fosfato pH 7,4
- Malonato de sodio 0,05 M
- Azul de metileno 0,001 M (diluido 1/20)
- Extracto enzimático
- Vaselina líquida

Técnica:

Tubo N°	1	2	3	4	5
Succinato de sodio (ml)	0.9	-	0.9	0.9	0.9
Buffer pH 7,4 (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Malonato de Na (ml)	-	-	0.2	-	-
Agua destilada (ml)	2.1	2.0	0.9	1.1	1.1
Azul de metileno (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Homogenato *	-	1.0	1.0	1.0	1.0

***ANTES DE AGREGAR EL HOMOGENATO LEER LAS SIGUIENTES INSTRUCCIONES:**

Tubo N° 2: agregar la cantidad de homogenato que se indica. Mezclar por inversión y colocar suavemente 1,0 ml de vaselina líquida. Tapar enseguida, con un tapón de goma y dejarlo en reposo. Proceder de la misma forma con el resto de los tubos con excepción del tubo 5.

Tubo N° 5: agregar la cantidad de enzima que se indica. Mezclar por inversión. NO agregar vaselina ni tapar. Al decolorarse el tubo N° 5, agítelo y observe. Después de decolorarse el tubo N° 4 y habiéndose constatado la inhibición en el tubo N° 3, agregar a éste, 0,9 ml de succinato de sodio para comprobar la inhibición competitiva con malonato de sodio.

Resultados

Registre el tiempo que demora en decolorarse el Azul de metileno en cada tubo.

Teniendo en cuenta la decoloración o no del azul de metileno en cada uno de los tubos, fundamente los resultados obtenidos.

BIBLIOGRAFÍA

- Blanco, A., "Química Biológica", Ed. El Ateneo, 8^{va} ed., Bs. As. (2006).
- Bacteriología General: Principios y Prácticas de Laboratorio. Editorial Universidad de Costa Rica. Capítulo 2.

TRABAJO PRÁCTICO N° 4

METABOLISMO DE LOS HIDRATOS DE CARBONO: VÍA GLICOLÍTICA

DEMOSTRACIÓN DE LA FERMENTACIÓN ANAERÓBICA EN

LEVADURAS

OBJETIVOS

- Analizar la fermentación anaeróbica en levaduras.
- Demostrar el efecto Pasteur utilizando técnicas de uso frecuente en el laboratorio.

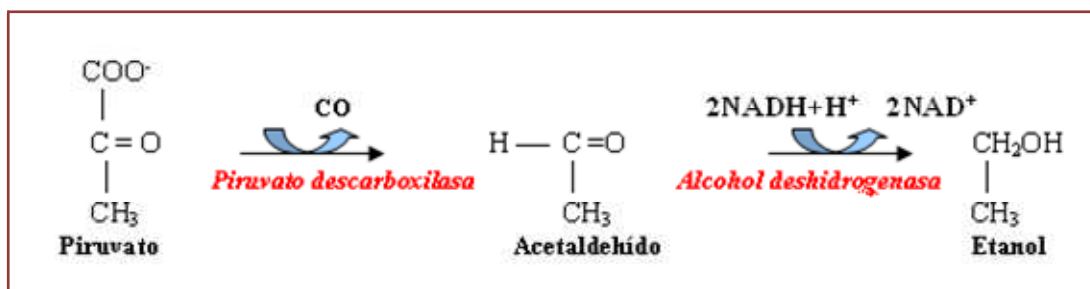
INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Las células animales, los microorganismos y las plantas utilizan como principal fuente de energía los hidratos de carbono. A partir de su degradación obtienen energía en forma de ATP y otros compuestos de alto contenido energético los cuales son utilizados en los procesos de biosíntesis. Los intermediarios metabólicos obtenidos de la degradación de la glucosa depende de las condiciones ambientales en que se encuentran las células, si la concentración de oxígeno es suficiente generalmente se degradan totalmente hasta CO_2 y H_2O . Por el contrario, cuando la concentración de oxígeno es escasa, las células recurren a la fermentación. A través de este proceso se obtienen diferentes tipos de intermediarios metabólicos según el tipo de células y de los sustratos disponibles. Por ejemplo:

-**Fermentación láctica:** ocurre en bacterias lácticas y gracias a este proceso se obtienen productos de origen lácteo tales como yogurt, y quesos. En el músculo esquelético humano cuando hay deficiencia de oxígeno, como por ejemplo, durante el ejercicio fuerte y continuo también se acumula ácido láctico.

-**Fermentación acética:** es la fermentación bacteriana por *Acetobacter sp.*, un género de bacterias aeróbicas, que transforma el alcohol en ácido acético. La fermentación acética del vino proporciona el vinagre.

-**Fermentación alcohólica:** un proceso anaeróbico realizado por las levaduras y algunas clases de bacterias. Estos microorganismos transforman el azúcar en alcohol etílico y dióxido de carbono. La glucosa se degrada a piruvato, el cual se transforma en etanol a través de dos reacciones consecutivas. Primero ocurre una descarboxilación de piruvato y luego la deshidrogenación del acetaldehído.



En la industria se aprovecha la capacidad de muchos microorganismos de acumular metabolitos que son de gran utilidad. Por ejemplo en la fabricación de pan y de vino se utilizan cepas diferentes de la levadura *Saccharomyces cereviceae*, para la obtención de CO_2 y etanol respectivamente.

Efecto pasteur

Louis Pasteur a mediados del siglo XX, demostró que ciertos microorganismos cultivados en condiciones anaeróbicas y expuestos al oxígeno, reducen el consumo de glucosa, esto se conoce como efecto Pasteur. Es un mecanismo de adaptación, por el cual la velocidad de utilización de glucosa es ajustada a los requerimientos celulares. Es decir, en anaerobiosis es necesario consumir mayor cantidad de glucosa para obtener el mismo rendimiento de ATP respecto de las condiciones aeróbicas.

El ajuste estaría determinado por las siguientes acciones: a) el aumento de los niveles de ATP y citrato que se produce en aerobiosis inhibe a la fosfofructo quinasa; b) la disminución de la actividad de fosfofructo quinasa provoca acumulación de los metabolitos de etapas anteriores, entre ellos la glucosa-6-fosfato. Esta sustancia inhibe la hexoquinasa y también el transporte de glucosa a través de la membrana. Se trata de efectos de retroalimentación, que contribuyen a disminuir la actividad glucolítica en presencia de oxígeno.

Demostración de la fermentación anaeróbica

En el Trabajo Práctico de Laboratorio se va a demostrar la fermentación anaeróbica de la levadura *Saccharomyces cereviceae* pudiendo compararse con la utilización de glucosa en condiciones aeróbicas.

Materiales y métodos

Reactivos

- Medio de cultivo:

- Extracto de levadura 0,01 g
- Glucosa 1,00 g
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1 g
- KH_2PO_4 0,04 g
- MgCl_2 0,04 g
- FeSO_4 0,01 g
- H_2O dest. c.s.p. 200 ml

pH: 4,5-5,00.

Inocular con 10 ml de una suspensión de levaduras (1g en 10 ml de H_2O) en erlenmeyers de 250 ml y 125 ml conteniendo 100 ml del medio de cultivo cada uno.

Incubar durante 24 h, el erlenmeyer de 250 ml en **condiciones aeróbicas**, en un shaker a 200 rpm. Al erlenmeyer de 150 ml agregar una capa de vaselina para crear **condiciones de anaerobiosis** y dejar en reposo.

Para proceder a la determinación de los metabolitos correspondientes se tomará una alícuota de 5 ml de cultivo de cada uno de los erlenmeyers, si es necesario se hace una centrifugación previa para evitar interferencias por sustancias en suspensión.

A- DETERMINACIÓN DE GLUCOSA

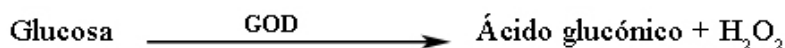
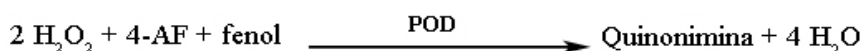
Los niveles de glucosa se determinaran cuantitativamente al comenzar y al finalizar la experiencia con el objeto de ver el consumo de la glucosa por la célula microbiana.

Se realizará por el método enzimático de la glucosa oxidasa siguiendo las instrucciones del equipo (kit) marca comercial Wiener.

Para determinar cuantitativamente la glucosa se usa el método de la glucosa oxidasa.

Fundamento del método

La glucosa es oxidada enzimáticamente por la glucosa oxidasa (GOD) a ácido glucónico y H_2O_2 , el cual en presencia de una peroxidasa (POD) produce la copulación oxidativa de fenol con 4- aminofenazona dando lugar a la formación de un cromógeno rojo con absorbancia a 505 nm de acuerdo a las siguientes reacciones:



La quinoneimina es un compuesto de color rojo, 4 (p-benzoquinona-monoimino) fenazona, que tiene un pico de absorción a 505 nm. La intensidad de color es proporcional a la concentración de glucosa.

La quinoneimina es un compuesto de color rojo, 4 (p-benzoquinona-monoimino) fenazona, que tiene un pico de absorción a 505 nm. La intensidad de color es proporcional a la concentración de glucosa.

Reactivos

- Testigo: solución de glucosa 1g/l.
- GOD/POD: Solución de glucosa oxidasa (1000 U/ml) y peroxidasa (120 U/ml)
- Reactivo 4-AF: solución de 4-aminofenazona 25 mmol/l en buffer Tris 0,92 mol/l.
- Reactivo Fenol: solución de fenol 55 mmol/l.
- Reactivo de trabajo: adicionar a 1000 ml de agua destilada, 50 partes del reactivo 4-AF, 50 partes de reactivo fenol. Agregar 3 partes de GOD/POD previamente homogeneizadas. Mezclar por inversión.

Actividades a desarrollar

Preparar tubos rotulados de la siguiente forma:

TUBO 1: Medio de cultivo inicial

TUBO 2: Muestra Anaeróbica

TUBO 3: Muestra Aeróbica

TUBOS	1	2	3	BLANCO	TESTIGO
Muestra (μl)	10	10	10	----	----
Estándar (μl)	---	-- -	---	----	10
Rvo. de trabajo (ml)	1	1	1	1	1

Mezclar e incubar 10 min a 37°C. Leer a 505 nm.

Resultados

Corregir las lecturas de absorbancia restando el valor de la misma de cada muestra con el obtenido en el tubo blanco.

Determinar la concentración de glucosa en cada uno de los tubos de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Glucosa g/l} = \text{AM} \times f$$

$$f = \frac{\text{Concentración del Testigo (1,0 g/l)}}{\text{AT}}$$

Donde:

AM= Absorbancia de la muestra corregida

AT = Absorbancia del testigo corregida

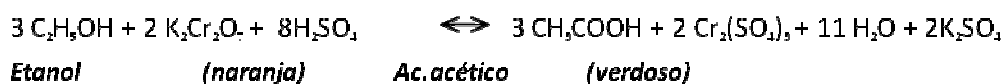
B) DETERMINACIÓN DE ETANOL

La producción de etanol será determinada utilizando el método de microdifusión.

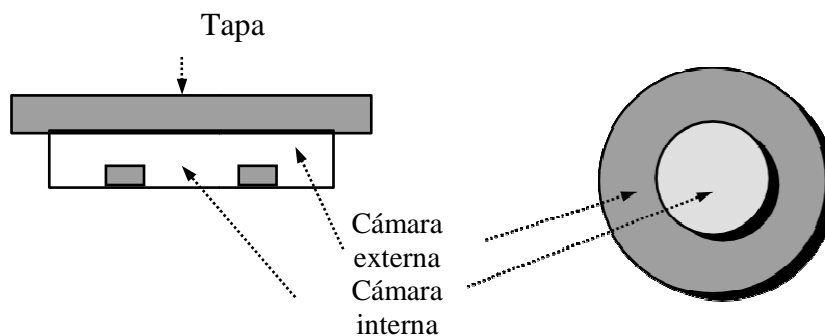
Método de microdifusión

Fundamento

El etanol reacciona con una solución de dicromato de potasio en medio sulfúrico causando la oxidación del alcohol a ácido acético y la reducción del ión dicromato (color naranja) a crómico (color verde).



El cambio de color de naranja a verde es indicativo de la reacción de reducción positiva. Esta determinación por microdifusión se realiza en celda de Conway, que consta de una cámara central y una externa, ambas recubiertas por una tapa común.



Representación esquemática de la celda de Conway

Reactivos

- Solución saturada de carbonato de potasio: Agregar a 9 ml de H_2O , K_2CO_3 hasta saturación.

- Dicromato de potasio en medio sulfúrico:

$Cr_2O_7K_2$ 0,9 g

H_2O dest. 34,50 ml

Ácido sulfúrico.....64,6 ml

Llevar a 150 ml con H_2O destilada.

- Testigo de etanol absoluto (4 g/l): 0,05 ml de etanol en 10 ml de solución fisiológica (0,9 % de NaCl).

Técnica

Colocar los reactivos en las cámaras externa e interna de las respectivas celdas de Conway con sumo cuidado evitando que se mezclen.

Cámara	Reactivos (ml)	Celda 1	Celda 2	Celda testigo
Central	Solución sulfúrica $K_2Cr_2O_7$	0,7	0,7	0,7
Externa	Solución saturada K_2CO_3	0,5	0,5	0,5
	Muestra (medio de cultivo 24 hs)	2,0 (Anaeróbico)	2,0 (Aeróbico)	-
	Solución Testigo, etanol absoluto	-	-	2,0

Tapar correctamente cada una de las celdas de Conway, colocando previamente vaselina en los bordes de las mismas. Incubar en estufa a $37^{\circ}C$ durante 15- 20 min aprox.

Transcurrido el tiempo de incubación señalado, observar la coloración de los reactivos en las cámaras centrales. Justifique los resultados.

BIBLIOGRAFÍA

- Blanco, A., “Química Biológica”, Ed. El Ateneo, 8^{va} ed., Bs. As. (2006).Cap.11.
- Fennema, O., “Química de los Alimentos”. 2^{da} ed. Acribia S.A. España (2000), Cap. 6.
- Conway, E.J., “Book Microdiffusion analysis and volumetric error”, pp. xviii + 465 pp (1957).

TRABAJO PRÁCTICO N° 5

DETERMINACIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO

OBJETIVOS

- ✚ Analizar el metabolismo de hidratos de carbono y ciclo de Krebs mediante la determinación del ácido cítrico generado por un cultivo de *Aspergillus niger*
- ✚ Demostrar la utilización de ácido cítrico en la industria alimentaria, determinando su presencia en distintos alimentos manufacturados.

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

El citrato es una sustancia natural presente en plantas y también es producido industrialmente a través de procesos microbiológicos, utilizando como fuente hongos filamentosos como por ejemplo: *Aspergillus niger* y especies del género *Penicillium*.

Alrededor del 60-65 % del ácido cítrico producido es utilizado en la industria alimentaria, un 10 % en la industria farmacéutica y un 25 % en la industria química. En la industria alimentaria se adiciona como conservante y para realzar el sabor. En la industria química se utiliza como agente antiespuma, como suavizante y para el tratamiento de textiles. Por ser fácilmente biodegradable también es utilizado en detergentes para reemplazar a los polifosfatos cuyo uso ha sido prohibido en muchos lugares.

Procedimiento general

Para determinar la producción de ácido cítrico en cultivo se utilizará la cepa mutante de *Aspergillus niger* NRRL-1419. Esta cepa es seleccionada específicamente por poseer la característica de producir la acumulación de grandes cantidades de ácido cítrico, cuando es cultivada en un medio con alto contenido de sacarosa.

Para la determinación de ácido cítrico en alimentos se utilizarán muestras de caldo concentrado, jugo de manzana y vino blanco de mesa, de marcas comerciales.

Inoculación de un medio de cultivo específico con *Aspergillus niger*

El hongo es inoculado en un erlenmeyer, conteniendo 100 ml de medio de cultivo estéril.

El medio contiene sacarosa como fuente de carbonos, extracto de levadura que aporta nitrógeno (desde aminoácidos), micronutrientes (vitaminas) y determinados minerales como Mg^{+2} , K^{+} y Cu^{+2} .

Se siembran 10 ml de un inóculo de *A. niger* y se incuba en condiciones aeróbicas, con agitación, a 28° C durante 5 días.

Obtención de las muestras para la determinación de ácido cítrico

La determinación de ácido cítrico se realizará en dos tipos de muestras diferentes: una muestra de cultivo de *Aspergillus niger* (M1) y una muestra proveniente de un producto alimenticio manufacturado (M2).

-Obtención de M1: tomar una alícuota de 5 ml de medio desde un cultivo de *Aspergillus niger*, centrifugar a 3000 rpm durante 5 min. El **sobrenadante será la muestra** utilizada para determinar ácido cítrico (M1).

-Obtención de M2: los productos utilizados para obtener M2 serán caldo concentrado para sopas (marca comercial), jugo de manzana (marca comercial) o vino blanco de mesa.

En los caldos concentrados para sopas, el ácido cítrico es agregado como secuestrante o quelante de iones metálicos y alcalinotérreos. De este modo, el ácido cítrico es un estabilizante que forma complejos con los iones evitando que alteren las propiedades de los alimentos. Los agentes secuestrantes empleados en la industria alimentaria son sustancias naturales, como los ácidos policarboxílicos (tartárico, oxálico, succínico) siendo el ácido cítrico y sus derivados los más utilizados.

En los jugos de manzana el ácido cítrico se utiliza como acidulante y realzante del sabor.

A diferencia de lo mencionado para caldos y jugos, en el vino blanco el ácido cítrico no es un aditivo, es decir que no es incorporado especialmente para lograr algún fin determinado. Sin embargo en el vino, el ácido cítrico puede estar presente, en muy baja concentración, como un producto paralelo a la fermentación alcohólica.

Método UV para la determinación de ácido cítrico en alimentos y otros materiales (Roche)

Fundamento

El ácido cítrico (citrato) es convertido a oxaloacetato en la reacción catalizada por la enzima citrato liasa (CL).



En presencia de la enzima L-malato deshidrogenasa (L-MDH) y de L-lactato deshidrogenasa (L-LDH), el oxaloacetato y su producto de decarboxilación, piruvato, se reducen a L-malato y L-lactato respectivamente, por medio actuando el NADH como dador de equivalentes de reducción.



La cantidad de NADH oxidado en las reacciones es estequiométrica con la cantidad de citrato. El NADH se mide por medio de su absorbancia a 334 nm.

Reactivos:

-Solución 1: buffer glicil-glicina; pH 7.8, L-malato deshidrogenasa (aproximadamente 136 U); L-lactato deshidrogenasa (aproximadamente 280 U); NADH (aproximadamente 12 U).

-Solución 2: citrato liasa (aproximadamente 12 U).

-Solución estándar de ácido cítrico.

Técnica

En dos cubetas de cuarzo diferentes agregar:

	Blanco	Muestra
Solución 1 (ml)	1,0	1,0
Muestra (ml)	--	0,2
H ₂ O bidestilada (ml)	2,0	1,8
Mezclar. Esperar aproximadamente 5 minutos y leer la absorbancia (Absorbancia 1). Agregar:		
Solución 2 (μl)	20	20
Mezclar. Esperar aproximadamente 5 minutos y leer la absorbancia (Absorbancia 2).		

Cálculos

Determinar la diferencia de absorbancias ($A_1 - A_2$) para el blanco y las muestras mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta A = (A_1 - A_2)_{\text{muestra}} - (A_1 - A_2)_{\text{blanco}}$$

Para calcular la concentración de ácido cítrico en la muestra utilizar la siguiente ecuación:

$$c = \frac{V \times PM}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A \text{ (g/l)}$$

Donde:

V = volumen final (ml)

v = volumen de muestra (ml)

PM = peso molecular del ácido cítrico (g/mol)

d = camino óptico (cm)

ϵ = coeficiente de extinción del NADH a 340nm: 6.3 (l x mmol⁻¹ x cm⁻¹)

BIBLIOGRAFÍA

- Blanco, A., “Química Biológica”, Ed. El Ateneo, 8^{va} ed., Bs. As. (2006). Cap. 11.
- Fennema, O., “Química de los Alimentos”. 2^{da} ed. Acribia S.A. España (2000), Cap. 6.
- Método UV para la determinación de ácido cítrico en alimentos y otros materiales. Roche, inserto-BOEHRINGER MANNHEIM / R-BIOPHARM. Enzymatic BioAnalysis/Food Analysis.
- Nelson D., Cox M. “Lehninger. Principios de Bioquímica”, Ed. Omega, 4^{ta} ed., Barcelona (2005). Cap. 14-15.

TRABAJO PRÁCTICO N° 6
METABOLISMO DE PROTEÍNAS
ACTIVIDAD DE INHIBIDORES DE PROTEASAS PRESENTES
EN SOJA

OBJETIVOS

- Determinar la actividad de inhibidores de proteasas en extractos de harinas crudas de soja sobre la actividad de proteasas de origen animal como Tripsina.
- Estudiar el comportamiento de los inhibidores de proteasas inactivados con calor.

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Proteasas

Las proteasas son enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos de proteínas adicionando una molécula de agua siendo estos procesos irreversibles.

En los vegetales las proteasas cumplen funciones fisiológicas, por ejemplo en semillas en germinación actúan sobre las proteínas de los depósitos proteicos liberando aminoácidos que luego serán utilizados para la síntesis de nuevas proteínas, síntesis de nucleótidos, ó que pueden ser transportados hacia la hoja y raíz en desarrollo.

En la industria alimentaria estas enzimas son utilizadas para mejorar las propiedades funcionales de las proteínas. Por ejemplo:

- a) Papaína (proteasa de origen vegetal) es utilizada para el ablandamiento de carnes, para prevenir la turbidez de la cerveza, en la preparación de hidrolizados proteicos, etc.
- b) Ciertas proteasas fúngicas son utilizadas en la precipitación de la caseína de la leche, para mejorar la textura del queso, etc.
- c) Algunas proteasas microbianas son utilizadas en la preparación de hidrolizados proteicos, para mejorar la textura de quesos, para prevenir la turbidez en cerveza, etc.

En los animales se encuentra una proteasa llamada **tripsina** que rompe los enlaces de las proteínas mediante hidrólisis, para formar péptidos de menor tamaño y aminoácidos libres. La tripsina es producida en el páncreas y secretada en el duodeno, donde es esencial para la digestión. Es producida en forma de tripsinógeno (enzima inactiva) y luego es activada a tripsina (enzima activa) en el duodeno, por la enteroquinasa intestinal, mediante hidrólisis peptídica.

El pH óptimo para su actividad enzimática es 8 y la temperatura óptima es de 37 °C. Es una enzima específica ya que lisa las uniones peptídicas donde el grupo carboxilo es aportado por residuos

Factores naturales antinutricionales en alimentos

Los factores antinutricionales naturales son constituyentes intrínsecos del alimento. Su presencia en la dieta humana o animal afecta el metabolismo y disminuye la biodisponibilidad de nutrientes. Entre ellos podemos mencionar factores antivitaminicos, inhibidores de proteasas, inhibidores de amilasas, entre otros.

Inhibidores de proteasas

Los inhibidores de proteasas son de naturaleza proteica, ubicuos en la naturaleza y se clasifican en familias de inhibidores, en base al tipo de proteasas que son capaces de inhibir.

Hasta ahora se han identificado 4 tipos inhibidores de proteasas, clasificadas en base al grupo activo presente en su centro de reacción, como serín-, cistein-, aspartil- y metalo-proteasas. Los inhibidores de proteasas más estudiados son los inhibidores de serín proteasas, habitualmente subdivididos en 8 familias en función de su secuencia aminoacídica primaria.

Familia	Proteasa inhibida
Inhibidores de serin proteasas: Inhibidores de soja (Inhibidor de Kunitz) Inhibidores de Bowman-Birk Inhibidores de cebada Inhibidores de patata tipo I Inhibidores de patata tipo II Inhibidores de calabacin Inhibidores funcionales de maíz 1-2 Serpina	Tripsina y quimiotripsina: Tripsina Tripsina- Quimiotripsina
Inhibidores de cisteín proteasas	Papaína, catepsinas B, H, L
Inhibidores de metalo proteasas	Carboxipeptidasas A, B
Inhibidores de aspartil proteasas	Catepsinas D

Algunos inhibidores de serín proteasas de plantas son bifuncionales y presentan actividad inhibidora tanto de la tripsina como de las alfa-amilasas. Existen también inhibidores que poseen más de un dominio, teniendo cada uno de ellos una actividad inhibidora de una proteasa específica.

Inhibidores de proteasas presentes en soja

En leguminosas como la soja o el poroto negro se encuentra una sustancia inhibidora de tripsina capaz de unirse a la enzima y formar un complejo inactivo. Entre los efectos tóxicos que genera en el ganado el consumo crónico de estas legumbres podemos citar: hiperplasia pancreática, hipersecreción pancreática de enzimas inactivas, disminución de aminoácidos azufrados, reducción de la absorción de grasas, retraso de crecimiento hasta el 30 o 40%. Estos efectos se deben en parte a que las enzimas pancreáticas (tripsina, quimotripsina) son ricas en aminoácidos azufrados, la hipertrofia y/o hiperplasia pancreática desvía estos aminoácidos esenciales de la síntesis proteica para sintetizar más enzimas generando un retraso en el crecimiento del animal.

El inhibidor de tripsina se destruye a través de tratamientos con calor. El grado de destrucción va a depender de factores como la relación tiempo-temperatura, volumen de sustancia y volumen de agua. La temperatura tiene un efecto crítico sobre el valor nutricional ya que un calentamiento excesivo de una materia prima puede afectar el rendimiento productivo del alimento. Altas temperaturas utilizadas para inactivar porotos de soja o subproductos generan reacciones químicas entre aminoácidos esenciales como lisina y azúcares reductores u otros aminoácidos disminuyendo su digestibilidad.

Por esta razón, pruebas para evaluar el grado de procesamiento de materias primas como la soja son motivo de gran interés para los laboratorios de control de calidad de tecnología en alimentos.

Reactivos

- Buffer de extracción (para el homogenato): buffer de fosfato de sodio 100 mM pH 7,5, adicionado con polivinilpirrolidona (PVP) al 1%, ácido ascórbico al 1%, KCl 1 mM, $MgCl_2$ 10 mM y EDTA 50mM.
- Buffer de reacción: buffer de fosfato de sodio 0,05 M pH 8.
- Sustrato: solución de azocaseína al 2 % en buffer de reacción. Una vez disuelta, agregar beta-mercapto-etanol 5mM BAJO

CAMPANAEXTRACTORA.

- Tripsina al 2,5mg/mL en buffer de fosfato de sodio 0,05 M pH 8.
- Solución precipitante y de detenimiento de reacción enzimática: ácido tricloroacético (TCA) al 5% en H₂O destilada.

Fundamento del método:

El método se basa en la demostración de la actividad de inhibidores de proteasas presentes en soja sobre la enzima tripsina de origen bovino, utilizando azocaseína como sustrato. También se demostrará la inactivación de estos inhibidores por tratamiento por calor.

La **azocaseína** es una proteína químicamente modificada, preparada por adición de grupos sulfanilamida (de color naranja unidos covalentemente a las uniones peptídicas) a la caseína, proteína abundante de la leche.

La acción enzimática de tripsina libera péptidos cortos y aminoácidos, en cantidad proporcional a la actividad de la enzima. Para determinar únicamente los productos de hidrólisis, es necesario precipitar la azocaseína no hidrolizada. Esto se debe a que los péptidos cortos y aminoácidos liberados provenientes de la azocaseína que se hidrolizó, tienen el mismo color que la proteína sin hidrolizar.

Para ello, se precipita el sustrato con TCA el cual además cumple la función de detener la reacción enzimática por precipitación de la enzima desnaturalizada.

Procedimiento

Preparación de homogenatos de harina de soja

- El homogenato se prepara a partir de harina de soja comercial con el agregado de buffer de extracción bien frío en una relación 1:4 (2,5 g de harina de soja en 10 mL de buffer de extracción).
- Homogeneizar en frío, agregando el buffer de extracción en pequeños volúmenes, hasta obtener un homogenato uniforme y líquido. Trabajar sobre hielo.
- Centrifugar a 5.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, extraer el sobrenadante y realizar una dilución 1:3 con buffer de extracción.
- Centrifugar nuevamente a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, extraer el sobrenadante y realizar una dilución 1:3 con buffer de extracción.
- Filtrar en filtros de 45 micras y colocar en tubos rotulados **control (C) y autoclavado(A)**.



- Autoclavar los tubos A durante 20 min, con el objeto de inactivar los inhibidores de proteasas.

Protocolo de trabajo

Adicionar los reactivos respetando el orden que se indica en la siguiente tabla:

Reactivos	Blanco para el Control sin Inhibidor (BCsI)	Control sin inhibidor	Blanco para el Tubo C (BC)	Tubo C	Blanco para el Tubo A (BA)	Tubo A
Azocaseína a 2%	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL
Extracto de Harina	--	--	150 µL	150 µL	--	--
Extracto de Harina Autoclava	--	--	--	--	150 µL	150 µL
Tripsina (2,5mg/mL)	--	200 µL	--	200 µL	--	200 µL
H ₂ O dest.	350 µL	150 µL	200 µL	--	200 µL	--
Incubar a 37 °C durante 30 minutos						
TCA 5%	400 µL	400 µL	400 µL	400 µL	400 µL	400 µL
Enfriar a 4°C durante 10 min						
Centrifugar a 12.000 rpm durante 10 min						
Extraer con CUIDADO el sobrenadante - Leer la Absorbancia a 366 nm						
Abs						

Cálculos

Porcentaje de Inhibición:

El **Control sin Inhibidor** representa el 100 % de actividad proteolítica de tripsina, es decir el 0 % de inhibición.

$$\frac{(\text{Abs Control sin Inhibidor} - \text{Abs BCsl})}{(\text{Abs M-Abs Bco})} \times 100 = X$$

$$\% \text{ de Inhibición} = 100\% \text{ de Actividad proteolítica} - X$$

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson R.L., Wolf W.J. "Compositional Changes in Trypsin Inhibitors, Phytic Acid, Saponins and Isoflavones Related to Soybean Processing". Journal of Nutrition. 1995; 0022:3166- 3195.
- Fisiología Vegetal, Salisbury- Ross, Grupo Edit. Iberoamérica, Cap. 15, pág. 345, 2003.